

Effekte einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie auf die Infarktgröße nach einem Schlaganfall im adulten Rattengehirn

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität

von Isabel Kaschowitz
geboren am 01.05.1984 in Gera

Gutachter:

1. PD Dr. M. Schwab
Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. PD Dr. R. Bauer
Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. A. Storch
Technische Universität Dresden

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon (Corticotropin)
AK	Antikörper
AP	Arbeitspuffer
AP+T	Arbeitspuffer + Triton-X-100
AP+T+S	Arbeitspuffer + Triton + Serum
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Bluthirnschranke
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon (Corticoliberin)
CV	Cresylviolett
DAB	Diaminobenzidine
DM	Dexamethason
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein (gliales fibrilläres saures Protein)
GK	Glukokortikoide
GR	Glukokortikoidrezeptor (Kortikosteroid-Rezeptortyp II)
HHN-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IR	Immunreaktivität
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MCA	middle cerebral artery (A. cerebri media)
MCAO	middle cerebral artery occlusion (Okklusion der A. cerebri media)
MR	Mineralokortikoidrezeptor (Kortikosteroid-Rezeptortyp I)
MW	Mittelwert
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
PBS	phosphate balanced salt solution (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd

PGHS-2	Prostaglandin-Synthase 2
SEM	standard-error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
sham	scheinoperiert
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumornekrosefaktor α
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Klinische Bedeutung einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie	3
2.2 Theorie der Fetalen Programmierung	4
2.3 Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie	6
2.3.1 Effekte auf die Hirnentwicklung und die Funktion des normalen Gehirns im späteren Leben	6
2.3.2 Kardiovaskuläre Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie	9
2.3.3 Zerebrovaskuläre Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie	10
2.3.4 Metabolische Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie	11
2.4 Glukokortikoid-Effekte auf eine zerebrale Ischämie	11
2.4.1 Akute Glukokortikoid-Effekte auf eine zerebrale Ischämie im sich entwickelnden Gehirn	11
2.4.2 Akute Glukokortikoid-Effekte auf eine zerebrale Ischämie im adulten Gehirn	13
3 ZIELE DER ARBEIT	15

4 MATERIAL UND METHODEN	17
4.1 Allgemeiner Versuchsablauf	17
4.1.1 Experimentelles Protokoll	17
4.1.2 Durchführung der MCAO	17
4.2 Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen	19
4.2.1 Gewinnung der Gehirnproben	19
4.2.2 Übersichtsfärbung mit CV	20
4.2.3 Immunhistochemische Darstellung von GFAP und MAP2	21
4.3 Lichtmikroskopische und bildverarbeitende Auswertung	24
4.4 Statistische Auswertung	26
5 ERGEBNISSE	27
5.1 Körpergewicht vor und nach MCAO/Sham-OP	27
5.2 Morphologie des normalen Rattengehirns	28
5.2.1 Größe des für die Auswertung genutzten Hemisphären- Volumens	28
5.2.2 Inhomogenitäten der Färbungen	29
5.2.2.1 CV-Färbung	29
5.2.2.2 MAP2-Färbung	30
5.2.2.3 GFAP-Färbung	31
5.3 Ischämische Hirnschädigung und Effekte von Dexamethason	32
5.3.1 Infarktgröße in der CV-Färbung	32
5.3.2 Infarktgröße in der MAP2-Färbung	34
5.3.3 Infarktgröße in der GFAP-Färbung	36
5.3.4 Vergleich der Infarktgröße in den verschiedenen Markierungen	39

5.4 Hemisphären-Größe und Effekte von Dexamethason	40
5.5 Hippokampale Schädigung und Effekte von Dexamethason	41
5.5.1 Hippokampale Schädigung in der CV-Färbung	41
5.5.2 Hippokampale Schädigung in der MAP2-Färbung	45
5.5.3 Hippokampale Schädigung im Vergleich von CV- und MAP2-Färbung	49
6 DISKUSSION	53
6.1 Methodendiskussion	53
6.1.1 Die Laborratte als Versuchstier	53
6.1.2 Die MCAO als fokales Ischämie-Modell	53
6.1.3 Hirninfarktlokalisationen nach MCAO	55
6.1.4 Variabilität der MCAO	59
6.1.4.1 Zerebrale Gefäßversorgung bei der Ratte	59
6.1.4.2 Einfluss des Alters	61
6.1.4.3 Einfluss unterschiedlicher Okklusionsmaterialien	62
6.1.4.4 Einfluss unterschiedlicher Okklusionszeiten und Reperfusion	63
6.1.4.5 Einfluss des Rattenstamms, systemischer Parameter und der Anästhesie	65
6.1.5 Verwendete Glukokortikoide und Dosierungen	67
6.1.6 Histologische Aufbereitung und Färbemethoden	67
6.1.6.1 Gewebefixation	67
6.1.6.2 Immunhistologische CV-Färbung	68
6.1.6.3 Immunhistochemische MAP2-Färbung	69
6.1.6.4 Immunhistochemische GFAP-Färbung	71
6.1.7 Lichtmikroskopische und bildverarbeitende Infarktgrößenbestimmung	73
6.2 Diskussion der Ergebnisse	76
6.2.1 Muster der zerebralen Hirnschädigung nach einer zerebralen Ischämie und Reperfusion	76

6.2.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie und der post- ischämischen Entzündungsreaktion	79
6.2.2.1 Energiemangel und Zusammenbruch des Membranpotentials	80
6.2.2.2 Laktatazidose	82
6.2.2.3 Störungen der Proteinsynthese	82
6.2.2.4 Hirnödementwicklung	83
6.2.2.5 Inflammatorische Reaktion	84
6.2.3 Einfluss des Geschlechts auf das Hirnvolumen und die ischämische Hirnschädigung	86
6.2.4 Effekte einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie	87
6.2.4.1 Dexamethason-Effekte auf die Hemisphären- Größe	87
6.2.4.2 Dexamethason-Effekte auf eine ischämische Hirnschädigung	88
6.2.5 Potentielle Mechanismen der neurotoxischen Glukokortikoid-Effekte	90
6.2.5.1 Fetale Programmierung	90
6.2.5.2 Akute Effekte erhöhter Glukokortikoid-Spiegel auf eine ischämische Hirnschädigung	93
 7 SCHLUSSFOLGERUNGEN	 96
 8 LITERATURVERZEICHNIS	 98
 9 ANHANG	 121
 9.1 Lebenslauf	 121
 9.2 Danksagung	 122
 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	 123

Du bist auf dem Wege zum Erfolg, wenn du begriffen hast, dass Verluste und Rückschläge nur Umwege sind.

C.W. Wendte

- meiner Familie -

1 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Glukokortikoiden (GK) in der klinisch genutzten Dosis zur Beschleunigung der Lungenreifung bei dem Risiko einer Frühgeburt auf die Entwicklung zerebrovaskulärer Erkrankungen im späteren Leben zu untersuchen. Hierfür fand das Modell einer Okklusion der A. cerebri media (MCA) -kurz MCAO- an der 2-jährigen Ratte, das heißt an der Ratte im Senium, seine Anwendung.

Eine antenatale GK-Gabe in der körpergewichtsadaptierten, klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis führt zur Programmierung von Hirnfunktionsstörungen und der Prädisposition kardiovaskulärer Erkrankungen im Alter. Über die Prädisposition zerebrovaskulärer Erkrankungen im Alter ist nichts bekannt. Diese ist denkbar, da antenatale GK vasokonstriktorische und neurotoxische Effekte haben. Sie bedingen eine Störung der Hirnentwicklung und programmieren eine Hyperaktivität der Stressachse im späteren Leben. Die Hyperaktivität der Stressachse geht mit einer erhöhten Kortisolausschüttung beim Menschen bzw. Kortikostersonausschüttung bei Ratten einher. Diese führt potentiell zu einer Desensitivierung der GR im Immunsystem, verbunden mit einer verminderten Immunsuppression und einer daraus resultierenden verstärkten sekundären Entzündungsreaktion im Anschluss an eine zerebrale Ischämie. Die sekundäre Entzündungsreaktion führt zu einer weiteren Vergrößerung des Hirninfarkt volumens. Folgerichtig resultieren erhöhte GK-Spiegel während einer zerebralen Ischämie in einem verschlechterten Schlaganfalloutcome. Unsere Arbeitshypothese lautet: Antenatal erhöhte GK-Spiegel führen über eine Hyperaktivität der Stressachse zu vergrößerten zerebralen Infarktarealen im Senium. Am 19. und 20. Gestationstag -entsprechend etwa dem Zeitpunkt der Hirnentwicklung in der 28. Schwangerschaftswoche (SSW) beim Menschen- erhielten 7 männliche und 8 weibliche Ratten die auf eine 70 kg schwere Schwangere adaptierte Dexamethason (DM)-Dosis (2 x 0,17 mg/kg Körpergewicht) in Anlehnung an die Dosisempfehlungen der NIH (NIH Consensus Statement 2000) zur Förderung der Lungenreifung. Währenddessen blieben die übrigen 9 männlichen und 8 weiblichen Ratten unbehandelt.

Im Alter von 2 Jahren wurden diese Ratten einer 30-minütigen MCAO unterzogen, wodurch ein reproduzierbarer Hirninfarkt induziert wurde. Zur Kontrolle wurden 6 weitere Ratten lediglich scheinoperiert (Sham-Tiere).

Die Quantifizierung des Hirninfarktes erfolgte 28 Tage später durch Cresylviolett (CV). Die Penumbra wurde durch die immunhistochemische Färbung mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein (MAP2) dargestellt. Die astrozytäre Gliose wurde durch die Immunfärbung mit dem glialen fibrillären sauren Protein (GFAP) visualisiert. Die Hirninfarktgröße, die Penumbra und die astrozytäre Gliose wurden lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems quantifiziert.

Die antenatal mit DM-vorbehandelten Männchen und Weibchen zeigten deutlich größere Hirninfarkte als die Kontrolltiere mit einem stärkeren neuronalen Zellschaden in Teilen des zerebralen Kortex, im Caudoputamen, im Corpus callosum sowie in der Capsula externa. So waren bei den mit DM-vorbehandelten männlichen und weiblichen Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren ein signifikant größerer Infarktkern (CV-Färbung) und eine größere Penumbra (MAP2-Immunfärbung) erkennbar, während eine tendenziell größere Infarktnarbe (GFAP-Immunfärbung) auffiel. Die antenatale GK-Gabe bewirkte in beiden Geschlechtern bei dem gegenüber einer zerebralen Ischämie besonders vulnerablen Hippokampus im Bereich der CA1-, CA2- und CA3-Region deutlich mehr nekrotische Zelluntergänge und eine größere Penumbra im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die klinisch genutzte antenatale GK-Gabe in der zur Beschleunigung der Lungenreifung verwendeten Dosis zu einer erhöhten Vulnerabilität des adulten Gehirns gegenüber ischämischen Insulten führt. Infolgedessen wirft eine antenatale GK-Therapie die Notwendigkeit einer strengen Indikationsstellung für jede individuelle Schwangerschaft auf und sollte unter Berücksichtigung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses intensiv abgewogen werden.

2 EINLEITUNG

2.1 Klinische Bedeutung einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie

Im Zusammenhang mit dem Management gegenüber einer drohenden Frühgeburt bei schwangeren Frauen gehören maternal applizierte GK mittlerweile zur klinischen Routine (Elitt et al. 2003). GK werden seit nunmehr 30 Jahren verwendet und haben sich als sicheres und effektives Therapeutikum zur Förderung der Lungenreifung erwiesen (Baud und Sola 2007). Aufgrund dessen werden GK in der täglichen Praxis bei Frauen mit dem Risiko einer Frühgeburt angewendet, um die fetale Lungenreifung zu beschleunigen, um das Auftreten bronchopulmonaler Dysplasien zu vermeiden, aber auch um die Inzidenz intraventrikulärer Hämorrhagien zu vermindern (Crowley et al. 1990, Ballard und Ballard 1995, Elimian et al. 1999). In Anlehnung an die 1994 und 2000 veröffentlichten Empfehlungen der US-amerikanischen National Institutes of Health (NIH) consensus conference (NIH 1995, NIH 2001) zur Routinemedikation von schwangeren Frauen mit einer drohenden Frühgeburt vor der 32. SSW gilt die antenatale GK-Applikation als eine wirksame Maßnahme, wodurch der Anteil der Schwangeren, die mit GK behandelt wurden, von 52% im Jahr 1995 auf 75% im Jahr 2000 in den USA anstieg (Meadow et al. 2003). Immerhin 9% und 12.3% aller Schwangerschaften in Deutschland (Frieese et al. 2003) und den USA (Martin et al. 2005) sind Frühgeburten, die im letzten Drittel der Schwangerschaft mit synthetischen GK behandelt werden. Die einmalige antenatale GK-Therapie reduziert durch die Verminderung der Inzidenz von Atemwegserkrankungen die Morbidität und Mortalität des Frühgeborenen und wird für Frauen mit einem Frühgeburtsrisiko in der 24. bis 34. SSW empfohlen (Baud 2004, Stiles 2007, Wapner et al. 2007). GK führen zu einer gesteigerten Surfactant-Produktion und einer erhöhten Lungencompliance (Stiles 2007). Die GK-Therapie übt -neben der Beschleunigung der Lungenreifung- positive Effekte auf die Reifung des fetalen Herzkreislaufsystems aus (Stein et al. 1993) und erleichtert somit den Übergang vom fetalen zum neonatalen Leben (Elitt et al. 2003). Außerdem ist beispielsweise die antenatale Gabe von Betamethason bei frühgeborenen Kindern mit einem verminderten Risiko einer periventrikulären Leukomalazie assoziiert (Elitt et al. 2003).

Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine antenatale GK-Gabe akute Nebenwirkungen auf das Herzkreislaufsystem, den Metabolismus und das Gehirn hat. Daneben bewirkt eine antenatale GK-Therapie chronische metabolische und zerebrale Nebenwirkungen und übt Langzeiteffekte auf das Herzkreislaufsystem aus. Einen Mechanismus für diese Langzeiteffekte stellt die Fetale Programmierung von Funktionsstörungen physiologischer Systeme dar.

2.2 Theorie der Fetalen Programmierung

Die Genese verschiedenster Erkrankungen baut sich auf einem multifaktoriellen Konzept auf, bei dem sowohl genetische Anlagen als auch deren Wechselwirkung mit exogenen Faktoren eine bedeutende Rolle spielen. Dabei wird häufig impliziert, dass diese Risikofaktoren postnatal auf uns einwirken. Solche epigenetischen Faktoren können jedoch bereits vor der Geburt eine unumkehrbare Prädisposition für Erkrankungen im späteren Leben darstellen, indem sie über eine Änderung der Genregulation und Genexpression (Wilkinson et al. 2007) in kritischen Phasen der fetalen Entwicklung die Funktion physiologischer Systeme dauerhaft modifizieren und dadurch pathogenetische Bedeutung erlangen können. Dieser Vorgang wird als „Fetale Programmierung“ bezeichnet und soll den Feten auf ein Leben unter den zu erwartenden veränderten Umweltbedingungen vorbereiten. Wesentliche programmierende Einflüsse sind eine suboptimale fetale Nährstoffversorgung, sei es durch mütterliche Mangelernährung oder eine Plazentainsuffizienz, und erhöhte fetale Stresshormonspiegel, z.B. durch mütterlichen Stress oder eine antenatale GK-Behandlung hervorgerufen.

Im Gegensatz zum Erwachsenen ist der Fetus bis auf die letzten Wochen vor der Geburt aufgrund der Unreife der fetalen Nebennierenrinde nicht in der Lage, Kortisol zu produzieren (Welberg und Seckl 2001). Aufgrund dessen hat selbst ein relativ geringer Übertritt von mütterlichem Kortisol eine erhebliche Bedeutung für den Feten. Ein mangelndes Nahrungsangebot hemmt außerdem das plazentare Enzym Hydroxysteroiddeoxygenase-2, welches 80-90% des mütterlichen Kortisols beim Übertritt in die fetale Zirkulation inaktiviert, um den Fetus vor exzessiven Kortisolspiegeln zu schützen (Welberg und Seckl 2001). Dies führt zu erhöhten fetalen Kortisolkonzentrationen. Die Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten erfolgt neben der plazentaren Übertragung von Kortisol auch durch eine Aktivierung der Bildung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) in der Plazenta,

dessen Synthese hier im Gegensatz zum Hypothalamus keiner negativen Rückkopplung unterliegt (Welberg und Seckl 2001). Die erhöhten GK-Spiegel in Folge von mütterlichem Stress, Fehlernährung oder antenataler GK-Gaben zur Förderung der Lungenreifung, führen zu einer Beeinflussung der Reifung verschiedener Organsysteme (z.B. Lunge, Herz und Gehirn) (Welberg und Seckl 2001).

Wird der Fetus während der Reifung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) im letzten Trimenon hohen GK-Konzentrationen ausgesetzt, kommt es zur Sollwertverstellung der im Hippokampus befindlichen, in die negative Rückkopplung involvierten Glukokortikoidrezeptoren (GR) im Sinne einer fortwährenden Desensitivierung, wodurch die negative Rückkopplung der Stressachse vermindert wird. Die während der Reifung auftretenden erhöhten GK-Spiegel werden zukünftig als physiologisch gewertet, verbunden mit einer resultierenden Toleranzentwicklung gegenüber höheren GK-Spiegeln und einer Ausschüttung höherer GK-Konzentrationen während einer Stresssituation. Erhöhte GK-Spiegel führen über eine Störung der Hirnreifung zu strukturellen Veränderungen des Gehirns und im Erwachsenenalter zu Störungen der neuronalen Erregbarkeit und der Funktion von Neurotransmittersystemen (Slotkin et al. 1996). Darüber hinaus ist die gestörte Sensitivität der HHN-Achse mit einer Änderung der Aktivität verschiedener Neurotransmittersysteme im späteren Leben assoziiert. In diesem Zusammenhang erhöhen antenataler Stress oder antenatale GK-Gaben beispielsweise den zerebralen Serotoninstoffwechsel im späteren Leben und vermindern somit den Serotoningehalt, ein Charakteristikum depressiver Erkrankungen (Slotkin et al. 1996).

Diese Störungen erklären die Verhaltensauffälligkeiten, kognitiven Defizite und psychomotorischen Störungen im Alter (Lemaire et al. 2000). Die akuten Effekte, aber auch die durch die Fetale Programmierung hervorgerufenen chronischen Effekte auf die Hirnfunktion sowie auf die kardiovaskulären und metabolischen Systeme sollen im Folgenden erklärt werden.

2.3 Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie

2.3.1 Effekte auf die Hirnentwicklung und die Funktion des normalen Gehirns im späteren Leben

Bereits eine einmalige antenatale GK-Gabe innerhalb einer vulnerablen Phase der Hirnentwicklung hat akute und chronische Effekte auf die Hirnstruktur und -funktion. Die Beeinflussung der Hirnfunktion im späteren Leben erfolgt über zwei wesentliche Mechanismen, die eng miteinander verbunden sind und hauptsächlich durch Kortisol und Wachstumshormone vermittelt werden: Zum einen die Modulation der strukturellen und funktionellen Hirnentwicklung und zum anderen programmierende Effekte auf die Hirnfunktion, ohne dass strukturelle Abnormitäten oder Funktionsstörungen während der Entwicklung nachweisbar sind.

Effekte auf die Hirnentwicklung

In Bezug auf die Beeinflussung der antenatalen Hirnentwicklung ist das Kortisol zwar essentiell für die normale Reifung des Zentralnervensystems (ZNS) (Matthews 2000), beschleunigt aber bei erhöhten Konzentrationen z.B. im Zusammenhang mit antenatalem Stress die Reifung des ZNS beim Menschen (Amiel-Tieson et al. 2004). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am fetalen Schaf konnte die Förderung der Reifung des REM, aber nicht des NREM Schlafes durch eine 4-tägige Betamethason-Gabe mehrere Wochen vor dem normalen Reifungstermin beobachtet werden (Schwab et al. 2005). Eine wiederholte Betamethasongabe hat dagegen keine zusätzlichen Effekte auf die funktionelle Hirnreifung, was auch gegen die Notwendigkeit einer wiederholten GK-Gabe zur Förderung der Lungenreifung spricht (Schwab et al. 2007). Sowohl zu niedrige als auch zu hohe GK-Spiegel wirken sich negativ auf die Hirnentwicklung aus. Demnach stimulieren stark erhöhte Stresshormonspiegel nicht mehr die Expression von Wachstumsfaktoren, sondern hemmen diese und tragen wahrscheinlich auf diese Weise zu den neurotoxischen Effekten bei (Chao et al. 1998).

Die konzentrationsabhängigen GK-Effekte können mit dem GR-System innerhalb des Hippokampus erklärt werden (Chao et al. 1998). Unter normalen Bedingungen bindet Kortisol mit einer hohen Affinität an Mineralokortikoidrezeptoren (MR), welche selektiv im Hippokampus und Hypothalamus vorkommen. Höhere Kortisolspiegel führen jedoch zu einer Sättigung der MR und zu einer verstärkten Bindung an GR.

Während die Aktivierung der MR die neuronale Integrität im Hippokampus aufrecht erhält, die kognitive Funktion und das Gedächtnis verbessert, führt im Gegensatz dazu die stärkere Aktivierung der GR während der zerebralen Entwicklung zu der verminderten Expression neurotropher Faktoren und zur Hemmung der Neuroneogenese, der neuronalen Differenzierung, der Synaptogenese und der Myelinisierung bis hin zur Neuronendegeneration (Uno et al. 1994). Solche Situationen treten vor allem im Zusammenhang mit ausgeprägtem antenatalen Stress und insbesondere während der antenatalen Therapie mit synthetischen GK, die selektiv mit hoher biologischer Potenz an GR binden, auf. Die GK-Gabe während einer kritischen Phase der Hirnentwicklung führt demnach zu einer Beeinträchtigung der Myelinisierung und der Zellproliferation, was wiederum Langzeiteffekte auf die Hirnfunktion nach sich ziehen kann (Baud 2004).

Beim Menschen ist die neuronale Zellproliferation vor der 22. SSW vollendet. Dieses Alter entspricht etwa dem einer einen Tag alten Ratte, die ein postnataler Hirnentwickler ist (Clancy et al. 2001).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am fetalen Schaf konnten nach einer einmaligen Betamethasonbehandlung in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis eine Hemmung der Myelinisierung nachweisen (Antonow-Schlorke et al. 2007). Darüber hinaus zeigte sich in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass antenatal mit der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis DM behandelte Ratten im Senium depressive Eigenschaften entwickeln.

Effekte auf die Hirnfunktion im späteren Leben

Neben der Störung der Hirnreifung gibt es außerdem programmierende Effekte auf die Hirnfunktion, ohne dass strukturelle Abnormitäten oder Funktionsstörungen während der Entwicklung auftreten (siehe 2.2). Auf struktureller Ebene geht die antenatal programmierte Hyperaktivität der HHN-Achse im späteren Leben mit einer Hemmung der Neuroneogenese bis hin zur neuronalen Degeneration einher (Uno et al. 1994). In diesem Zusammenhang induziert eine antenatale Gabe von DM bei Rhesusaffen eine dosisabhängige Degeneration von pyramidalen Neuronen innerhalb der CA2- und CA3-Region und von Zellen des Gyrus dentatus im Hippokampus (Uno et al. 1990). Ursächlich hierfür ist, dass der massive Reifungsstimulus der GK zu Lasten einer Wachstums hemmung (Differenzierung statt

Proliferation) geht (Welberg und Seckl 2001). Bei den antenatal mit GK behandelten Babies war aufgrund dessen ebenfalls ein vermindertes Hirnwachstum nachweisbar (Modi et al. 2001). Dagegen haben wiederholte GK-Gaben keine zusätzlichen Effekte auf die funktionelle Hirnreifung und führen zur Abnahme des fetalen Körpergewichts bei Tier und Mensch (French et al. 1999, Wapner et al. 2007). Sollte die Mutter nicht in eine Frühgeburt kommen, hält die GK-Wirkung nur eine Woche an (Wapner et al. 2007). Eine Wiederholung der Induktion der Lungenreifung im Zusammenhang mit einer wiederholten GK-Gabe setzt jedoch voraus, dass die Reifungsprozesse seit der letzten Gabe rückläufig sind. Diese Vermutung widerspricht dem Paradigma, dass Reifungsprozesse nicht rückgängig zu machen sind.

Die Betamethason-Gabe in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis bedingt zudem eine Störung des neuronalen Zytoskeletts, indem es zu einer Abnahme der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (insbesondere des MAP2) kommt (Schwab et al. 2000). MAP2 erfüllt als ein essentieller Bestandteil des Zytoskeletts bedeutende Aufgaben im Zusammenhang mit der normalen neuronalen Integrität, wie beispielsweise der Erhaltung der Nervenzellform sowie des intrazellulären Transportes (Bershadsky und Vasiliev 1989, Li et al. 2000). Es dient als früher Marker für eine neuronale Schädigung (Li et al. 2000).

Obwohl die genauen Mechanismen, die zu der GK-vermittelten Neurotoxizität führen, noch nicht vollständig verstanden sind, ist vermutlich eine gesteigerte Vulnerabilität gegenüber dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat ein wesentlicher Faktor (Son et al. 2006). Neben der Regulierung der Konzentrationen neuronaler Transmitter haben GK darüber hinaus verschiedene steuernde Wirkungen auf Neurone und Gliazellen, wie beispielsweise die Beeinflussung der Signaltransduktion, der Vulnerabilität gegenüber schädlichen Agens, sowie der Kognition und sensorischen Reizermittlung (Mobley und Sulser 1980, Sapolsky et al. 1986). GK haben im gesamten Leben modulierende Effekte auf die Funktion des Hippokampus und damit auf Kognition, Verhalten und Gedächtnis (Sapolsky 2003).

Während die antenatale GK-Therapie widersprüchliche Ergebnisse auf die akuten und chronischen, neuroprotektiven und -toxischen Wirkungen liefert (siehe 2.4), gilt die postnatale GK-Therapie sicher auch beim Menschen als Verursacher zerebraler Entwicklungsstörungen (Shinwell et al. 2000, Baud 2004). Auf diese Weise wird die postnatale Therapie mit DM oder Betamethason -zur Förderung der Lungenreifung- in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für Zerebralpareesen gebracht, wobei diese

insbesondere im Zusammenhang mit einer frühen postnatalen DM oder Betamethason-Gabe auftreten (Shinwell et al. 2000, Baud 2004, Shinwell et al. 2007). Neben den akuten und möglichen chronischen Effekten einer postnatalen GK-Gabe auf die Hirnentwicklung sind auch metabolische und Herz-Kreislauf-Nebenwirkungen bekannt (Baud 2004). Ebenso zeigt auch die antenatale GK-Gabe im Verlauf akute und chronische Effekte auf das Herzkreislaußsystem sowie zerebrale und metabolische Nebenwirkungen.

2.3.2 Kardiovaskuläre Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie

Akute Effekte

Aufgrund der peripheren Vasokonstriktion im Anschluss an eine antenatal verabreichte GK-Gabe kommt es beim Feten speziesübergreifend zu einem akuten arteriellen Blutdruckanstieg (Schwab et al. 2000, Koenen et al. 2002). In dieser Hinsicht beeinflussen das Kortisol und die synthetisch-hergestellten GK (wie z.B. Betamethason) den femoralen Gefäßwiderstand in Schafen im Sinne einer Erhöhung, wodurch ein Anstieg des fetalen Blutdrucks bedingt wird (Schwab 2007). Demnach sind die Femoralarterien von mit Betamethason-behandelten fetalen Schafen deutlich sensibler gegenüber einer Kalium-induzierten Depolarisation, während Vasodilatoren (wie z.B. Bradykinin) wesentlich weniger wirksam sind (Anwar et al. 1999). Diese Veränderungen führen letztendlich zu einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes sowie zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (Derks et al. 1997).

Chronische Effekte

Eine antenatale GK-Gabe in der klinisch verwendeten gewichtsadaptierten Dosis bewirkt direkt die Prädisposition für einen arteriellen Hypertonus über eine Hemmung der Nephrogenese und eine konsekutive Überforderung der verbleibenden Nephronen sowie eine Aktivitätsänderung des Renin-Angiotensin-Systems (Barker et al. 2006). Darüber hinaus ist eine dauerhaft erhöhte Empfindlichkeit der Gefäße für vasokonstriktorische Mediatoren und eine Störung insbesondere der Stickstoffmonoxid (NO)-vermittelten Vasodilatation involviert (Tauzin et al. 2005). So ist in Folge der beeinträchtigten endothelialen NO-Wirkung und der prostaglandinabhängigen Signaltransduktionswege eine gestörte Relaxation zu

beobachten. Eine im Zusammenhang mit der antenatalen GK-Gabe zusätzlich auftretende Hyperaktivität der Stressachse (siehe 2.2) bewirkt außerdem die Prädisposition für einen arteriellen Hypertonus. Daneben sind GK-induzierte metabolische Veränderungen per se ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen.

2.3.3 Zerebrovaskuläre Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie

Nach antenataler GK-Gabe in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis kann neben der Erhöhung des peripheren Gefäßtonus ebenso eine Erhöhung des zerebralen Gefäßtonus beobachtet werden (Schwab et al. 2000).

In einer Studie an fetalen Schafen kann ein Abfall der Hirndurchblutung innerhalb von 24 Stunden nach GK-Gabe in allen Hirnregionen -außer im Hippokampus- beobachtet werden (Schwab et al. 2000). Daneben spricht ein gesteigerter zerebraler Gefäßwiderstand für den vasokonstriktorischen Effekt der GK auf die fetale Hirndurchblutung. Eben dieser Mechanismus scheint den Feten vor einer intraventrikulären Hämorrhagie zu bewahren (Schwab et al. 2000).

Eine Langzeit-Behandlung mit GK über 12 Wochen resultiert bei adulten Ratten in einem Abfall der hippokampalen Durchblutung (Endo et al. 1997). Umgekehrt ist die Adrenalectomie bei adulten Ratten begleitet von einer verminderten Produktion von Kortisol, was wiederum eine verstärkte Hirndurchblutung von über 50% innerhalb des Hippokampus und von über 20% in präfrontalen, kortikalen Regionen zur Folge hat (Endo et al. 1994).

Im Gegensatz dazu führt die Erhöhung des Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Partialdruckes zur Dilatation der zerebralen Gefäße, wobei verschiedenartige Faktoren, wie z.B. Stickoxide, Adenosine und die Aktivierung von Kaliumkanälen in diesen Vorgang mit einbezogen sind (Faraci und Heistad 1998). Eine Betamethason-Gabe führt zur Hemmung der CO₂-induzierten zerebralen Vasodilatation (Schwab et al. 2000). Darüber hinaus hemmen GK die induzierte -jedoch nicht die basale- Prostaglandinsynthese über eine Inhibition der Prostaglandin-Synthase 2 (PGHS-2), was wiederum zu einer Reduktion der Hirndurchblutung führt (Dahlgren et al. 1981, Masferrer und Seibert 1994, Goppelt-Strübe 1997). Daneben führt die Minderung der Hirndurchblutung infolge einer Betamethason-Gabe in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am fetalen Schaf zu einer Verringerung der Sauerstoffversorgung in

subkortikalen Strukturen und dem Hirnstamm, wobei die Sauerstoffversorgung in den Bereichen des parietotemporalen Kortex am geringsten ausfällt (Schwab et al. 2000).

2.3.4 Metabolische Nebenwirkungen einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie

Stresshormone sind effiziente Regulatoren des Glucose-Stoffwechsels. Darüber hinaus sind antenatal erhöhte GK-Spiegel entscheidend bei der Entstehung des metabolischen Syndroms beteiligt (McMillen und Robinson 2005, Bréant et al. 2006, Phillips et al. 2006). Antenatal erhöhte GK-Spiegel führen zu einer Verminderung der Zahl insulinproduzierender Betazellen im Pankreas und zur dauerhaften Änderung der Aktivität von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese und Glykolyse. Die Insulinsensitivität wird vermindert und die Funktion der Adipozyten beeinflusst. Der Organismus wird auf ein geringes Nährstoffangebot und eine optimale Nährstoffverwertung im späteren Leben vorbereitet. Eine reichliche oder selbst normale postnatale Ernährung führt zu einer Überforderung des Systems und zur Entwicklung von Adipositas, Arteriosklerose und eines Diabetes mellitus Typ II. Diese metabolischen Veränderungen können damit zur Entstehung kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen (wie z.B. einem Schlaganfall) beitragen.

2.4 Glukokortikoid-Effekte auf eine zerebrale Ischämie

2.4.1 Akute Glukokortikoid-Effekte auf eine zerebrale Ischämie im sich entwickelnden Gehirn

Im Gegensatz zum adulten Gehirn hat die Akutbehandlung mit DM bei neonatalen Ratten protektive Effekte gegenüber einem hypoxisch-ischämischen Hirnschaden, wobei der genaue Wirkungsmechanismus noch immer unklar ist (Tuor 1997). Darüber hinaus verfügen antenatal verabreichte GK in der klinisch verwendeten gewichtsadaptierten Dosis über einen protektiven Effekt gegenüber perinatalen intraventrikulären Blutungen (Elimian et al. 1999). Da die Vorbehandlung mit einem GK-Antagonisten (RU38486) die Inhibition der protektiven Effekte bewirkt (Tuor und Del Bigio 1996), ist es wahrscheinlich, dass die DM-bedingten Veränderungen über GR vermittelt werden (Tuor 1997). Die Neuroprotektion steht vermutlich hauptsächlich im Zusammenhang mit Veränderungen des zerebralen Metabolismus. GK haben katabole Stoffwechseleigenschaften und bewirken die Induktion antioxidativer Enzyme, die Enzyminduktion mit folgender Lipolyse und Ketogenese,

die Erhöhung des Energie-Phosphat-Spiegels und die Ausbildung einer relativen Hyperglykämie (Tuor und Del Bigio 1996, Tuor 1997). Letztere ist gekennzeichnet durch eine erhöhte systemische Glucose-Verfügbarkeit, wodurch einerseits die Aufrechterhaltung einer konstanten Glucose-Utilisation und andererseits die Verlängerung eines adäquaten anaeroben Stoffwechsels auch während eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens im sich entwickelnden Gehirn gewährleistet werden. In dieser Hinsicht bedingen GK einen effizienteren Gebrauch energiereicher Substrate und reduzieren den basalen Energiestoffwechsel (Tuor 1997). Außerdem sind Stoffwechseleränderungen innerhalb des Gehirns vermutlich ebenfalls in den Vorgang der Neuroprotektion durch GK involviert, u.a. über eine Senkung des Energiebedarfs (z.B. durch Verminderung der Proteinsynthese oder der metabolischen Glucose-Umsatzrate) oder über eine Steigerung der Energie-Vorräte (z.B. Glykogen) (Tuor und Del Bigio 1996). Diesbezüglich wurde eine deutliche Reduktion von energiereichen Substraten innerhalb der ischämischen Hemisphäre während einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung beobachtet, während es bei den mit DM-vorbehandelten, neonatalen Ratten keinerlei Veränderungen zu verzeichnen gab (Tuor 1997). Hierbei wurden den 7 Tage alten Ratten im Voraus an eine hypoxisch-ischämische Hirnschädigung täglich 0,5 mg/kg Körpergewicht DM für die Dauer von 3 Tagen verabreicht (Tuor 1997). Während die DM-Gabe im Zusammenhang mit einem hypoxisch-ischämischen Hirnschaden die Aufrechterhaltung eines relativ konstanten Blutglucose-Spiegels bewirkt, resultiert das in Ratten endogen vorkommende Kortikosteron zwar auch in einer Reduktion eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens, allerdings fällt der Blutglucose-Spiegel hier ab (Tuor und Del Bigio 1996). Aufgrund der geringen Korrelation zwischen dem Blutglucose-Spiegel und dem Ausmaß des Infarktareals sind vermutlich die neuroprotektiven Effekte der GK kein alleiniges Resultat der relativen Hyperglykämie während eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens. So spielen wahrscheinlich die protektiven GK-Effekte gegenüber der Ausbildung eines vasogenen Ödems -GK stabilisieren die Bluthirnschranke (BHS)- und die antiinflammatorische Reaktion aufgrund der immunsuppressiven Wirkung gleichermaßen eine Rolle bei der Neuroprotektion (Tuor und Del Bigio 1996).

Eine hochdosierte Vorbehandlung mit 40 mg/kg Körpergewicht DM, einer Dosis die beinahe 100-fach so hoch ist wie die verwendete Dosis bei Tuor (Tuor 1997), hat bei neonatalen, 7 Tage alten Ratten demgegenüber auch schädigende Einflüsse (Altman

et al. 1984). Diese äußern sich u.a. in einer Steigerung der Mortalitätsrate in Folge eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens (Altman et al. 1984).

2.4.2 Akute Glukokortikoid-Effekte auf eine zerebrale Ischämie im adulten Gehirn

Im Unterschied zu den neuroprotektiven Effekten bei neonatalen Ratten (siehe 2.4.1) hat die nachträgliche GK-Gabe im Zusammenhang mit einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung (Tuor 1997) und auch deren Anwendung bei adulten Ratten keine oder die Hirnschädigung verstärkende Effekte (Sapolsky und Pulsinelli 1985). DM hat lediglich bei jungen (≤ 2 Wochen alt), nicht aber bei älteren Ratten (≥ 4 Wochen alt) protektive Effekte (Tuor et al. 1995), mit der Voraussetzung einer Applikation 3 bis 4 Stunden vor einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die GK-vermittelte Reaktion mit Ereignissen interveniert, die wiederum in adulten -aber nicht in jungen- Ratten zum neuronalen Tod führen (Sapolsky und Pulsinelli 1985, Norris und Hacinski 1986).

In Übereinstimmung damit wirken GK beim adulten -anders als beim sich entwickelnden- Gehirn in supraphysiologische Dosen neurotoxisch und verstärken einen hypoxisch-ischämischen Hirnschaden (Sapolsky und Pulsinelli 1985, Hassan et al. 1996). Insbesondere die zerebralen Regionen mit einer großen Zahl an GR (z.B. Neokortex und Caudoputamen) reagieren vulnerabel auf eine zerebrale Hypoxie bzw. Ischämie, wobei GK die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung in diesen Regionen verstärken (Sapolsky und Pulsinelli 1985). Ursächlich hierfür ist u.a. eine GK-bedingte Hyperglykämie, die im weiteren Verlauf unter ischämischen Bedingungen zu einer Verstärkung der anaeroben Glykolyse und damit verbunden zu einer vermehrten Laktatbildung mit konsekutivem pH-Wert-Abfall führt (Raichle 1983, Sapolsky und Pulsinelli 1985, Sugo et al. 2002). Darüber hinaus haben die pyramidalen Neurone in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus einen hohen GR-Besatz, weshalb vor allem diese Regionen eine deutliche Vulnerabilität gegenüber ischämischen Ereignissen aufweisen (Smith-Swintosky et al. 1996).

Die zerebrale Ischämie an sich stellt einen Stress-induzierenden Faktor dar, wobei die im Zusammenhang mit einem Schlaganfall aktivierte Stressachse zu einer Erhöhung der GK-Konzentrationen im Blut führt (Sugo et al. 2002). Es wird vermutet, dass die erhöhten GK-Spiegel die Neurone nicht direkt schädigen, sondern vielmehr einen sublethalen Zustand in Folge einer katabolischen Krise erzeugen, woraufhin

die betroffenen Neurone weniger widerstandsfähig gegenüber einer zerebralen Ischämie sind (Sugo et al. 2002).

Dennoch bleibt der Aspekt umstritten, da in diversen Studien mit hoch dosierten GK-Gaben ein positiver Effekt auf Rückenmarksschädigungen (Behrmann et al. 1994) und experimentelle zerebrale Ischämien erreicht werden konnte (Hall 1992, De Courten-Myers et al. 1994). In diesem Zusammenhang funktionieren GK als Antioxidantien, Stabilisatoren der BHS und haben eine antiödematöse Wirkung, weswegen sie als ein Behandlungsansatz in Modellen einer Rückenmarksschädigung oder zerebralen Ischämie getestet werden (Anderson et al. 1994, Liu et al. 2000). GK sind bekannt als potente Inhibitoren der sekundären Entzündungsreaktion, wobei sie die Hemmung der Zytokin-Produktion, die Störung der Phagozytose und die verminderte Einwanderung von Neutrophilen und Makrophagen in die betroffenen inflammatorischen Regionen bedingen (Liu et al. 2000, Slivka und Murphy 2001). Die reduzierte sekundäre Entzündungsreaktion hat die Verminderung der hypoxisch-ischämischen Zelluntergänge zur Folge.

3 ZIELE DER ARBEIT

Die antenatale GK-Therapie sichert seit nunmehr 30 Jahren das Überleben von Frühgeborenen zwischen der 24. und 34. SSW, indem sie die fetale Lungenreifung beschleunigt, das Auftreten bronchopulmonaler Dysplasien verhindert und die Inzidenz intraventrikulärer Hämorrhagien reduziert (siehe 2.1). Jedoch finden sich in jüngerer Zeit wiederholt Hinweise auf nichtpulmonale Nebenwirkungen der GK. Den GK werden sowohl akute neuroprotektive Effekte (insbesondere im sich entwickelnden Gehirn), als auch eine die hypoxisch-ischämische Schädigung verstärkende Wirkung (vor allem im adulten Gehirn) nachgesagt (siehe 2.4). Außerdem haben experimentelle Studien an der Ratte, am Schaf und am nicht-menschlichen Primaten akute neurotoxische Effekte im sich entwickelnden und adulten Gehirn nachgewiesen (siehe 2.4) und die zerebro- und kardiovaskulären Nebenwirkungen einer antenatalen GK-Therapie beim Feten aufgezeigt (siehe 2.3). Neben den akuten Effekten führt eine antenatale GK-Gabe zur Programmierung von Hirnfunktionsstörungen und der Prädisposition kardiovaskulärer Erkrankungen im Alter (siehe 2.2). Obwohl der Schlaganfall die häufigste Erkrankung im Alter darstellt, ist deren Zusammenhang mit antenatal erhöhten GK-Spiegeln (durch mütterlichen Stress, Fehlernährung oder eine antenatale GK-Therapie) nur wenig erforscht. Da die antenatale GK-Therapie zur Förderung der Lungenreifung erst seit ca. 30 Jahren durchgeführt wird, stehen die klinischen Untersuchungen im Zusammenhang mit einem Schlaganfall noch aus (nur selten gibt es derart junge Schlaganfall-Patienten). Im Gegensatz zu den unseres Wissens nach nur am neonatalen Rattenmodell gewonnenen Ergebnissen über die Effekte einer antenatalen GK-Therapie auf eine hypoxisch-ischämische Hirnschädigung (Tuor 1997), untersuchten wir die Wirkung einer antenatalen GK-Therapie auf die Ausprägung eines Schlaganfalls bei der Ratte im Senium. Wir wollten die folgenden Hypothesen bei der klinischen Anwendung einer antenatalen GK-Therapie prüfen:

Eine antenatale GK-Gabe in der körpergewichtsadaptierten, klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis, resultiert in einer Vergrößerung des infarzierten Areals im Anschluss an eine MCAO bei der Ratte im Senium. Ursächlich hierfür ist die Fetale Programmierung einer Hyperaktivität der HHN-Achse im späteren Leben. Die Hyperaktivität der HHN-Achse bedingt eine

Desensitivierung der GR im Immunsystem mit einer verminderten Immunsuppression und einer daraus resultierenden verstärkten sekundären Entzündungsreaktion im Anschluss an eine zerebrale Ischämie. Zusätzlich kommt es zur Programmierung einer endothelialen Dysfunktion, in dessen Folge der zerebrale Gefäßtonus erhöht wird.

Zur Überprüfung der gestellten Hypothesen wurden die histologischen Auswirkungen einer fokalen, zerebralen Ischämie in Folge einer MCAO an Ratten im Senium untersucht, die bereits antenatal am 19. und 20. Gestationstag (entsprechend der 28. SSW beim Menschen) DM in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung verwendeten Dosis erhielten. Die Größe des zerebralen Infarktareals wurde mit der konventionellen CV-Färbung quantifiziert. Die Penumbra wurde mit Hilfe der MAP2-Immunfärbung dargestellt. Die astrozytäre Gliose wurde durch die GFAP-Immunfärbung visualisiert.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen ihren Beitrag zur Aufdeckung der möglichen zerebralen Nebenwirkung einer antenatalen GK-Therapie leisten und auf diese Weise ein kritisches Abwägen dieser Behandlung unter Berücksichtigung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses erreichen.

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeiner Versuchsablauf

4.1.1 Experimentelles Protokoll

Die Genehmigung der Untersuchungen erfolgte durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen. Die durchgeführten Experimente fanden am Institut für Versuchstierkunde (IVTK) der Friedrich-Schiller-Universität Jena statt, wobei als Versuchstiere insgesamt 39 Wistar-Ratten in einem Alter von 2 Jahren verwendet wurden. Mir selbst oblag die histologische Untersuchung, dennoch möchte ich in diesem Kontext zur besseren Veranschaulichung den gesamten Versuch erläutern.

Von den insgesamt 39 Tieren erhielten 16 Ratten bereits antenatal am 19. und 20. Gestationstag via mütterlicher, intraperitonealer Applikation jeweils 60 µg DM, während die übrigen 23 Ratten keinerlei Medikamente verabreicht bekamen.

Im Alter von 2 Jahren wurde diesen Versuchstieren eine zerebrale Ischämie durch die temporäre MCAO mit dem Fadenmodell (Zea Longa et al. 1989) induziert. Hierfür randomisierte man die 20 männlichen und 19 weiblichen Wistar-Ratten in 3 Gruppen, wobei man alle 16 mit DM-vorbehandelten Ratten sowie 17 der insgesamt 23 unbehandelten Ratten einer Ischämie aussetzte, während 6 der unbehandelten Versuchstiere scheinoperiert wurden (Sham-Tiere). Nach dem 7. und 28. post-operativen Tag wurden die Ratten Verhaltenstests unterzogen, was nicht Thema dieser Arbeit war. Zu den Tests gehörten der Watermazeset, der Open- und Dark Field-Verhaltenstest sowie der Test auf Depressivität (Glucosetest). Der kompletten Versuchsreihe ging das Handling, eine sogenannte Gewöhnungsphase zwischen Versuchsleiter und Ratten, voraus. Außerdem wurden zur Überprüfung der motorischen Funktion ein Leiter- und ein Zylindertest durchgeführt.

4.1.2 Durchführung der MCAO

Zur Untersuchung der Infarktgröße bei adulten Ratten wurden diese einer MCAO unterzogen (Abb. 1). Zu Beginn der Operation wurde die Narkose mit einem Gasgemisch aus Isofluran (3,5%) sowie Lachgas (N₂O) und Sauerstoff (O₂) im Verhältnis 40 zu 20 eingeleitet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose im weiteren Operationsverlauf diente Isofluran (1,5%) sowie Lachgas und Sauerstoff erneut im Verhältnis 40 zu 20. Während der Versuchsanordnung wurde das Versuchstier

mittels rektaler Temperaturmessung auf eine gleichbleibende Körpertemperatur hin untersucht. Die narkotisierte Wistar-Ratte wurde nun zum Zwecke der Stabilisierung an die Unterlage fixiert und an Brust- und Halsfell rasiert. Es folgte ein Medianschnitt durch die Haut. Nachdem das subkutane Fett- und Bindegewebe auseinander präpariert wurde, wurde die Arteria carotis communis freigelegt, um diese nun vorsichtig vom Nervus vagus zu lösen und an ihrem unteren Ende mit einem Faden (Perma-Hand-Seide, EH 6831H, Ethicon) zu umschlingen. Es folgte die Freilegung des Gefäßes nach distal bis zur Bifurkation der Arteria carotis externa und interna. Die Arteria carotis externa sowie die Arteria occipitalis als Ast der Arteria carotis interna wurden beide mit Hilfe eines Fadens abgebunden, während proximal der Carotis-Bifurkation eine Gefäßklemme angesetzt wurde. Zusätzlich erfolgte eine Ligation der Arteria carotis communis ca. 1 cm proximal der Carotis-Bifurkation. Zwischen dem Gefäßclip und der Ligation wurde die Arteria carotis communis inzisiert und ein zuvor gefertigter Silikon-beschichteter Faden (Ethilon, EH 6751, Ethicon) unter optischer Kontrolle bis auf eine Länge von 17 mm in das Gefäß eingeführt und mit dem Gefäßclip fixiert (Abb. 1). Hierbei erfolgte die Okklusion der MCA entweder auf der rechten oder linken Seite per Zufall, um einen Einfluß der Händigkeit der Ratte auf die Ergebnisse auszuschließen.

Die Wunde am Hals wurde temporär vernäht und die Ratte in den Käfig zurückgesetzt. Nach 30-minütiger Okklusion wurde die Wistar-Ratte erneut in Narkose versetzt. Nun wurde der Faden aus der Arteria carotis interna entfernt und die Arteria carotis communis an der Carotis-Bifurkation ligiert. Eine Reperfusion der MCA erfolgte über Kollateralen von der Arteria basilaris über den hinteren Stromkreislauf und der kontralateralen Seite. Letztlich erfolgte erneut eine Hautnaht, um die Wunde zu verschließen und somit vor einer auftretenden Infektion zu schützen. Im Anschluss an die Operation wurden die Versuchstiere in einen Käfig gebracht und mit Wasser und Nahrung ad libitum versorgt.

Die zuvor festgesetzte Überlebenszeit von 28 Tagen postoperativ erreichten 38 von den insgesamt 39 Versuchstieren. Eine männliche, mit DM-vorbehandelte Ratte verstarb nach 22 Tagen postoperativ und wurde aus der Versuchsreihe ausgeschlossen.

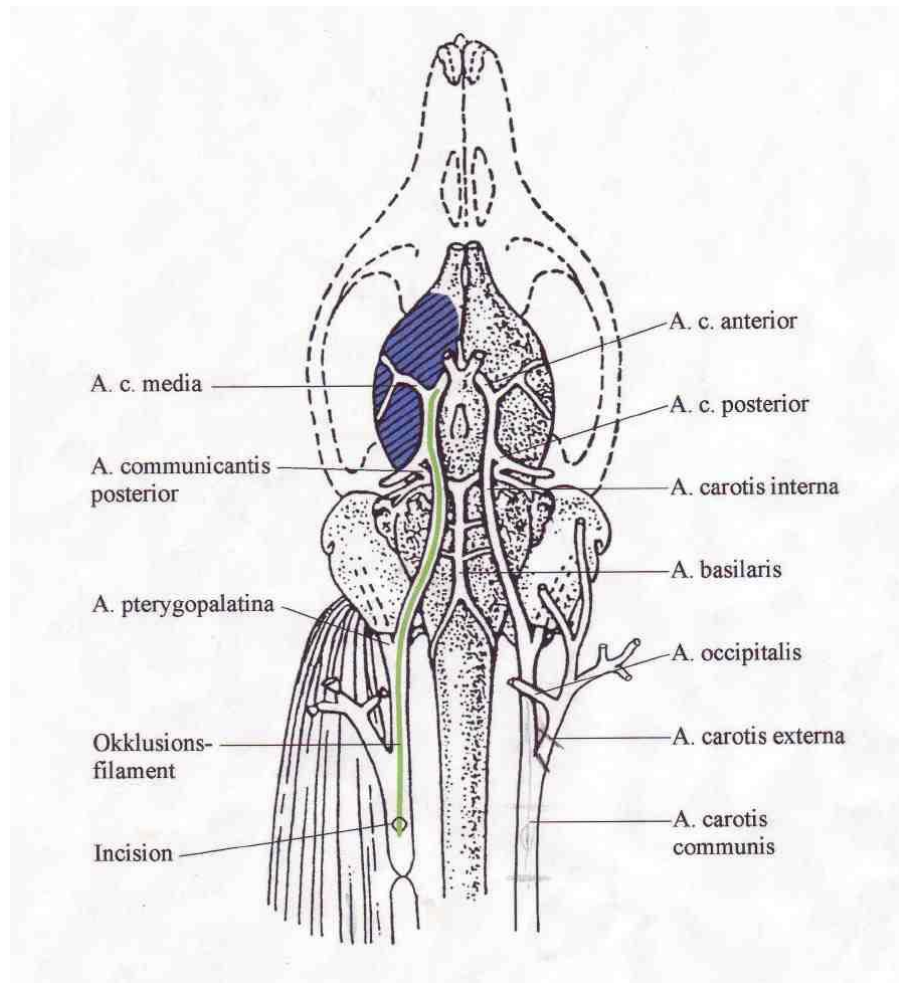


Abb. 1: Schema der MCAO-Versuchsanordnung. Beachte den in die A. carotis interna eingeführten Okklusionsfaden. A. c.: A. cerebri.

4.2 Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen

4.2.1 Gewinnung der Gehirnproben

Die Gehirne der 38 Wistar-Ratten wurden 28 Tagen postoperativ durch Perfusionsfixierung gewonnen (Böck 1989). Hierfür wurden die Versuchstiere mit Hilfe der Äthernarkose narkotisiert und anschließend auf dem Rücken liegend an der Unterlage fixiert. Anschließend wurde der Thorax nach einem medianen Schnitt und dem seitlichen Abschieben der Brusthaut eröffnet, die Thoraxhälften auseinander gezogen und das Herz durch Spalten des Herzbeutels freigelegt. Der linke Ventrikel wurde an der Herzspitze eröffnet und die mit Flüssigkeit gefüllte Kanüle (eine im Durchmesser an die Aorta des zu fixierenden Tieres angepasste Knopfkanüle) bis in die aufsteigende Aorta eingeführt und festgeklemmt. Um den stetigen, freien Abfluss des Fixiermittels zu gewährleisten, wurde das rechte Herzohr eröffnet. Gleichzeitig

begann die Perfusion mit Phosphatpuffer (PBS) für 2 Minuten mit einem Volumenfluss von 3,0 bis 3,3 ml pro Minute, um das Gefäßsystem leerspülen. Der Perfusionsdruck wurde dem normalen Blutdruck der jeweiligen Versuchstiere angepasst. Nun wurde das Gehirn durch die 8-minütige Perfusion mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurde die Kalotte abpräpariert, das Gehirn vorsichtig freipräpariert und in 4%igem PFA über Nacht nachfixiert. Zur weiteren histologischen Aufarbeitung wurde das Gehirn unter Verwendung einer Gehirnmatrix (Rodent Brain Matrix, Precision Brain Slicer, Braintree Scientific, Inc., USA) in 1 mm dicke Blöcke standardisiert geschnitten und in einer Histokinette (Leica TP 1020, Nussloch, Deutschland) automatisch in Paraffin überführt. 7 µm dicke Gewebeschnitte wurden an einem Rotationsmikrotom (Rotationsmikrotom, HM 335E, Microm, Deutschland) angefertigt, auf mit Vectabond TM Reagent (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) vorbehandelte Objektträger (SuperFrost, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und bei Raumtemperatur (entspricht 20°C) luftgetrocknet. Für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils aufeinander folgende Schnitte aus ausgewählten Ebenen (von Ebene 1, dem Bregma 4,70 mm entsprechend bis Ebene 6, dem Bregma -6,30 mm entsprechend) verwendet.

4.2.2 Übersichtsfärbung mit CV

Die Übersichtsfärbung mit CV (1 A 396 Cresylecht-violett, Cresyl Fast Violet, Waldeck GmbH & Co, Division Chroma, Münster, Deutschland) diente vor allem der Darstellung des zerebralen Infarkts. CV ist ein basischer Farbstoff, der an basophile Strukturen wie RNA oder auch DNA bindet und daher die „Nissl-Schollen“ (diese entsprechen dem rauen endoplasmatischen Retikulum, dem wiederum zahlreiche RNA-haltige Ribosomen angelagert sind) und die Nukleoli violett anfärbt. Die Schnitte durchliefen zunächst zum Zwecke der Entparaffinierung eine absteigende Alkoholreihe, bevor sie in destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült wurden. Anschließend folgte ein 6-minütiges Bad in einer CV-Lösung bei 60°C. Daraufhin wurden die Schnitte erneut in Aqua dest. gespült sowie in eine aufsteigende Alkoholreihe eingebracht. Abschließend ließ man die Schnitte für 5 Minuten in einem Behältnis mit Xylolersatz Neoclear (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) stehen und konservierte sie durch den Einschluss mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt). Die Tab. 1 zeigt den genauen Ablauf der Färbung mit CV.

Tab. 1: Protokoll für CV-Färbung.

Nr.	Präparationsschritt	Dauer / min	T / °C
1	Entparaffinierung		
	Xylolersatz Neoclear I	10	RT
	Xylolersatz Neoclear II	10	RT
	Isoporopanol 100%	5	RT
	Isoporopanol 100%	5	RT
	Isoporopanol 80%	5	RT
	Isoporopanol 50%	5	RT
2	Spülung mit Aqua dest.	5	RT
3	Färbung mit Cresylviolett	6	60
4	Spülung mit Aqua dest.	2	RT
5	Entwässerung		
	Isoporopanol 70%	1½	RT
	Isoporopanol 70%	1½	RT
	Isoporopanol 96%	1½	RT
	Isoporopanol 96%	1½	RT
	Isoporopanol 100%	1½	RT
	Isoporopanol 100%	1½	RT
	Xylolersatz Neoclear	5	RT
6	Eindecken mit Entellan		

4.2.3 Immunhistochemische Darstellung von MAP2 und GFAP

Bei der immunhistochemischen Färbung des MAP2 werden funktionale Störungen von Neuronen aufgezeigt und darüber hinaus ischämie-induzierte neuronale Schäden detektiert (Bershadsky und Vasiliev 1989, Kitagawa et al. 1989). Im Gegensatz dazu ist GFAP ein Hauptbestandteil des Intermediärfilaments im Zytoplasma von radikalen Gliazellen und daraus entstehenden Astrozyten im ZNS, weshalb es als einer deren Indikatorsubstanzen anzusehen ist (Herrera und Cuello 1992).

Beide immunohistochemischen Färbungen wurden mit Hilfe der ABC-Methode für Paraffinschnitte durchgeführt, wobei die Schnitte zunächst zum Entparaffinieren eine absteigende Alkoholreihe durchliefen. In diesem Zusammenhang wurden die Schnitte zweimalig für jeweils 10 Minuten in ein Bad aus Xylolersatz Neoclear (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) gegeben, bevor sie nacheinander für je 5 Minuten in Küvetten mit Isopropanol (Isopropanol, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) gestellt wurden. Im Anschluss daran wurden die Präparate 20 Minuten in 0,6%igem

Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) inkubiert, um eine Inhibition endogener Peroxidasereaktionen zu erreichen. Es folgte eine 5-minütige Spülung mit Aqua dest. sowie die Blockierung reaktiver Aldehydgruppen durch die Inkubation der Schnitte in 0,5%igem Natriumborhydrid (NaBH_4 , Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) für weitere 20 Minuten. Daraufhin wurde erneut für mindestens 5 Minuten in Aqua dest. gespült. Nun erfolgten nacheinander die Spülungen mit PBS und Arbeitspuffer (500 ml PBS in Verbindung mit 250 μl Tween 20 und 2,5 g Rinderserum-Albumin, beides Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) mit Triton-X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) (AP + T) für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurde Normalserum (Mouse IgG Horse Vectastain-Serum, ABC KIT, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) aufgetragen und eine Einwirkzeit von 30 Minuten bei 37°C eingehalten, um eine Besetzung unspezifischer Bindungsplätze zu erreichen. Anschließend wurde der primäre Antikörper (AK) (GFAP 1:600, MAB360 Ms X GFAP, Chemicon International, Temecula, Kanada; MAP2 1:500, monoclonal Anti-MAP2 abc Clone HM-2, Mouse Ascites Fluid, M 4403, Sigma-Aldrich Inc., Missouri, USA) in Kombination mit AP + T + S aufgegeben und für mindestens 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde zunächst zweimal für je 5 Minuten mit AP + T gespült, bevor schließlich der biotinylierte sekundäre AK (Anti-Mouse IgG, PK-6102, Biotinylated Antibody, Vector Laboratories, Burlingame, USA) aufgetragen und für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde. Nun folgte erneut eine zweimalige Spülung mit AP + T für je 5 Minuten bei Raumtemperatur. Im folgenden Schritt wurde der ABC-Komplex (ABC KIT Vectastain, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) aus Reagenz A (Avidin) und B (biotinylierte Enzyme) zum Zeitpunkt ihres Aktivitätsmaximums aufgetragen und bei 37°C für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde erneut für jeweils 5 Minuten mit AP + T, PBS und Aqua dest. gespült, um die Proben von überschüssigen Komplexen zu befreien. Im nächsten Schritt wurde die immunhistochemische Reaktion mit DAB (Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) visualisiert. Nach dem Abspülen überschüssiger DAB-Mengen in Aqua dest. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Letztendlich wurden die Schnitte mittels des Einschliessmediums Entellan (Merck KGaA, Darmstadt) unter Deckgläschen eingeschlossen und somit konserviert. Anhand von Negativkontrollen, wobei das Aufbringen des primären AK

durch die Verwendung von Normalserum ersetzt wurde, konnten unspezifische Färbungen ausgeschlossen werden. Das detaillierte Färbeprotokoll ist Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Protokoll der immunhistochemischen Färbungen nach der ABC-Methode.

Vorgang	Medium	Dauer	T / °C	Bemerkungen
Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe	2x Xylolersatz Neoclear	je 10 min	RT	
	Isopropanol 100%	5 min	RT	
	Isopropanol 100%	5 min	RT	
	Isopropanol 80%	5 min	RT	
	Isopropanol 50%	5 min	RT	
Block endogener Peroxidase	Isopropanol 50% + H ₂ O ₂	20 min	RT	80 ml Isopropanol 50% + 1 ml H ₂ O ₂ (30%)
	Aqua dest.	5 min	RT	
Block Aldehydgruppen	NaBH ₄	20 min	RT	50 mg NaBH ₄ / 100 ml Aqua dest.
	Aqua dest.	10 min	RT	
	PBS	5 min	RT	
	AP + T	5 min	RT	10 ml AP + 5 µl Triton-X- 100
Normalserum	AP + T + Serum	30 min	37 °C	150 µl Serum / 10 ml AP +T
Primärer Antikörper (GFAP bzw. MAP2)	AK + AP/T/S	12 h	4 °C	GFAP 1:600 MAP2 1:500
	AP +T	5 min	RT	
	AP +T	5 min	RT	
Sekundärer Antikörper	Sekundärer AK + AP/T/S	2 h	37 °C	Sekundärer AK aus ABC- Kit, 5 µl Sekundärer AK in 1 ml AP+T+S
	AP +T	5 min	RT	
	AP +T	5 min	RT	
ABC-Komplex	AP+T+Lösung A+Lösung B	1 h	37 °C	Lösung A+Lösung B aus ABC-Kit, je 20 µl in 1 ml AP+T+S
	AP + T	5 min	RT	
	PBS	5 min	RT	
	PBS	5 min	RT	
	Aqua dest.	5 min	RT	
Visualisierung	3'3-Diaminobenzidin	< 10 min	RT	1 Set (0,2 mg/ml H ₂ O ₂ + 0,7 mg/ml DAB) für 5 ml Aqua dest.
	Aqua dest.	5 min	RT	
	Aqua dest.	5 min	RT	
Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe	Isopropanol 50%	5 min	RT	
	Isopropanol 80%	5 min	RT	
	Isopropanol 100%	5 min	RT	
	Isopropanol 100%	5 min	RT	
	2x Xylolersatz Neoclear	je 10 min	RT	
Einschließen	Entellan			

4.3 Lichtmikroskopische und bildverarbeitende Auswertung

Die Begutachtung der Schnittqualität, der Güte der Perfusionsfixierung und letztlich der Verteilung der immunhistochemischen Markierungen erfolgte am Lichtmikroskop AXIOSKOP (Color Video Camera, CCD-Iris, Aalen, Deutschland). Alle Aufnahmen wurden mit identischen Einstellungen an ein und derselben Kamera (AxioCam MRc5, Stemi SV 6, Zeiss, Deutschland) durchgeführt und mit Hilfe eines Weißabgleichs standardisiert, wodurch es letztendlich keinerlei Unterschiede bezüglich diverser Mikroskop- (Vergrößerung, Filter, Helligkeit, Kontrast) und Kameraparameter (Belichtungszeit) zu verzeichnen gab.

Die MCAO resultierte sowohl in einem kortikalen Infarkt als auch in einer Schädigung des Hippokampus, welche wiederum zum Zelltod hippokampaler Neurone führte (Butler et al. 2002). Das geschädigte Gewebe wurde beispielhaft anhand der sichtbaren Gewebeuntergänge innerhalb der Hippokampusregion mittels Mikroskopie des Originalschnitts in der CV und MAP2-Färbung identifiziert (Vergrößerung: 25x für CV bzw. 4x für MAP2, Axioplan2 imaging, Zeiss, Deutschland). Zur Differenzierung von geschädigtem versus vitalem Hippokampus-Gewebe wurden im Voraus Schwellenwerte untergegangener Zellen pro hippokampaler Region (Subiculum, CA1/CA2, CA3, CA4, inneres und äußeres Blatt des Gyrus dentatus) innerhalb der gleichen Schnittebene jeder Ratte (dem größten Nekrose-Ausmaß entsprechend) festgelegt. Diese entsprachen einerseits dem Anteil nekrotischer Zellen (für die CV-Färbung), andererseits dem Verlust der MAP2-Immunreaktivität (IR) und wurden in 0-10% (Ziffer: 1), 10-50% (Ziffer: 2), >50-90% (Ziffer: 3) oder >90% (Ziffer: 4) der Gesamtzellzahl bzw. -fläche der entsprechenden Region angegeben. Degenerationen im Hippokampus äußerten sich vor allem durch Zellschrumpfungen, Dunkelfärbung, Kondensation und bzw. oder Atrophie der Dendriten (Sapolsky 1990). Überdies wurden nekrotische Neurone über eine Eosinophilie des Zytoplasmas oder einem Affinitätsverlust gegenüber CV identifiziert (Garcia 1997).

Nach der direkten lichtmikroskopischen Begutachtung der Präparate wurden die Schnitte eingescannt (Vergrößerung: 1,2x, MRc5-Kamera, Zeiss, Deutschland). Anschließend wurden die eingescannten und digital gespeicherten Schnitte mittels eines Bildverarbeitungsprogramms (Scion Image 1.62, NIH public domain, USA) ausgewertet. Dazu wurden die Bilder der Schnitte in Graustufenbilder umgewandelt. So erfolgte die Auswertung der einzelnen Aufnahmen im Schwarz-Weiß-Modus, wobei die Farbbilder ebenso wie die mikroskopischen Bilder des originalen

Präparates zur visuellen Kontrolle hinzugezogen wurden. Anhand der visuellen Kontrolle wurde für jeden vorhandenen Gehirnschnitt ein individueller Schwellenwert festgelegt, um die genaue Fläche der Färbung (CV-Verlust) bzw. Immunmarkierung mit MAP2 und GFAP bestimmen zu können. Sämtliche Grauwerte, die unterhalb dieses Grenzwertes lagen, galten als nicht markiert, während die Strukturen mit Grauwerten gleich oder oberhalb des Schwellenwertes eine positive Immunmarkierung zugesprochen bekamen. Zur Vermeidung von Störsignalen innerhalb der einzelnen Färbungen wurden für die CV-gefärbten Schnitte ein Grünfilter und für die GFAP- und MAP2-gefärbten Schnitte ein Blaufilter eingesetzt. Im Rahmen der analytischen Bearbeitung wurden 2 Parameter gemessen. Dazu zählten sowohl die Fläche (mm²) als auch die mittlere optische Dichte (proportionaler digitaler Messwert: arbitrary units) der Immunmarkierung. Infolge der Unabhängigkeit der gewonnenen Ergebnisse von Färbeartefakten, wurde sich auf die Betrachtung des Parameters der Fläche beschränkt. Zur exakten Quantifizierung der Fläche wurden vor der Auswertung die eingescannten Schnitte über einen Maßstab geeicht. Im weiteren Verlauf wurden für jeden einzelnen Schnitt folgende Parameter bestimmt:

1. die vollständige Fläche des Bildes zur Kontrolle der Vergrößerung,
2. die Flächen der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre,
3. die Fläche der Markierung (für CV, MAP2 und GFAP) innerhalb der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre,
4. die Fläche der Ventrikel der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre.

Aus den ermittelten Flächen wurde das gesamte Volumen der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre, das Volumen der Ventrikel sowie das Infarktvolumen (CV), das Volumen des Infarkts und der Penumbra (MAP2) und das Volumen der Infarktnarbe (GFAP) als Fläche des Hirnschnitts multipliziert mit dessen Abstand zum nachfolgenden Schnitt (anhand der Bregma-Ebenen) bestimmt.

Färbeartefakte oder (operationsbedingte) Gewebeartefakte, wie z.B. Gewebeverluste, -überlagerungen oder Ähnliches wurden bei der Auswertung berücksichtigt.

4.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 13.0 und 15.0 für Windows) verwendet und die Ergebnisse als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) wiedergegeben. Unterschiede zwischen dem Infarktvolumen (CV), dem Infarkt- und Penumbrevolumen (MAP2) und dem Narbenvolumen (GFAP) wurden innerhalb der Sham-Tiere, der Kontrolltiere und der mit DM-vorbehandelten Ratten mittels einer einfaktoriellen one way ANOVA geprüft. Darüber hinaus wurden Unterschiede zwischen den Sham- und den Kontrolltieren sowie den mit DM-vorbehandelten Tieren innerhalb der Färbungen bezüglich des Volumens der Hemisphären, der Markierung und der Ventrikel sowie des Ausmaßes der Hippokampus-Nekrose mit Hilfe der one way ANOVA untersucht. Unterschiede hinsichtlich der Körpergewichte zwischen Sham- und Kontrolltieren sowie mit DM-vorbehandelten Ratten wurden ebenfalls mittels einfaktorieller one way ANOVA geprüft. Die Alpha-Adjustierung für die multiplen Tests erfolgte nach Bonferroni.

Der Geschlechtervergleich bezüglich des Volumens der Hemisphären und der Ventrikel sowie des Infarktvolumens (CV), des Infarkt- und Penumbrevolumens (MAP2) und des Narbenvolumens (GFAP) erfolgte mit dem T-Test für unabhängige Stichproben mit anschließender Alpha-Adjustierung nach Holm (Holm 1979). Dem Voraus ging ein Levene-Test zur Kontrolle der Varianzgleichheit. Intraindividual wurden Unterschiede zwischen der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphäre bezüglich des Volumens der Hemisphären und der Ventrikel sowie des Infarktvolumens (CV), des Infarkt- und Penumbrevolumens (MAP2) und des Narbenvolumens (GFAP) mit dem T-Test für gepaarte Stichproben mit anschließender Alpha-Adjustierung nach Holm (Holm 1979) geprüft. Unterschiede der hippokampalen Nekrose der Sham- und Kontrolltiere sowie der mit DM-vorbehandelten Tiere wurden zwischen der CV- und der MAP2-Färbung ebenso mit Hilfe des T-Tests für gepaarte Stichproben mit anschließender Alpha-Adjustierung nach Holm (Holm 1979) ermittelt.

Bei allen oben genannten Signifikanztests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Körpergewicht vor und nach MCAO/Sham-OP

Die verwendeten Versuchstiere wurden hinsichtlich ihres Körpergewichts zu jeweils 2 Zeitpunkten untersucht. Zum einen im Zusammenhang mit der Durchführung der MCAO bzw. Sham-Operation und zum anderen 28 Tage später während der Perfusion. Die resultierenden MW verdeutlichten eine schwache Abnahme des Körpergewichts innerhalb der besagten Zeitspanne bei allen Gruppen, außer den weiblichen Sham-Tieren, bei denen eine Gewichtszunahme registriert wurde (Tab. 3). Während bei den männlichen Sham-Tieren sowie den männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten die Abnahme des Körpergewichtes signifikant war ($p \leq 0,05$, Tab. 3), wurde bei den männlichen und weiblichen Kontrolltieren lediglich eine starke Tendenz bezüglich der Gewichtsabnahme festgestellt. Tatsächlich war die Gewichtsabnahme bei den männlichen als auch weiblichen mit DM-behandelten Tieren wesentlich stärker als bei den Kontrolltieren (Tab. 3). Zum Zeitpunkt der Perfusion waren deshalb die männlichen mit DM-vorbehandelten Tiere leichter als die männlichen Kontrolltiere ($p \leq 0,05$), wobei die Weibchen eine ähnliche Tendenz zeigten (Tab. 3).

Tab. 3: Körpergewicht (in Gramm) bei Durchführung der MCAO/Sham-Operation und Perfusion. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu vor MCAO/Sham-Operation, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Kontrolltieren, MW \pm SEM)

Gruppe	Anzahl	Gewicht vor MCAO / Sham-Operation [g]	Gewicht Perfusion [g]	Gewichtsänderung [g]
Sham				
Männlich	3	483,0 \pm 12,1	474,7 \pm 13,0 *	-8,3 \pm 0,9
Weiblich	3	271,0 \pm 23,3	273,7 \pm 14,7	+2,7 \pm 8,6
MCAO / Kontrolle				
Männlich	9	525,7 \pm 13,3	516,2 \pm 11,0	-9,4 \pm 6,3
Weiblich	8	323,1 \pm 16,9	315,1 \pm 13,2	-8,0 \pm 6,5
MCAO & DM				
Männlich	7	504,0 \pm 19,1	458,4 \pm 21,6 * °	-45,6 \pm 15,2
Weiblich	8	306,1 \pm 17,8	285,3 \pm 18,5 *	-20,9 \pm 7,2

5.2 Morphologie des normalen Rattengehirns

5.2.1 Größe des für die Auswertung genutzten Hemisphären-Volumens

Zur Bestimmung der morphologischen Eigenschaften des normalen Rattengehirns wurden die Sham-Tiere verwendet. Für die Festlegung der günstigsten Färbung zur Bestimmung des Hemisphären-Volumens wurde die Hemisphären-Größe über die CV-, MAP2- und GFAP-Färbung ermittelt (Abb. 2 und 3). Es ergab sich bei den Männchen (Abb. 2) und Weibchen (Abb. 3) kein Unterschied zwischen den Färbungen, so dass im Weiteren nur noch die CV-Färbung zur Volumenbestimmung der Hemisphäre verwendet wurde.

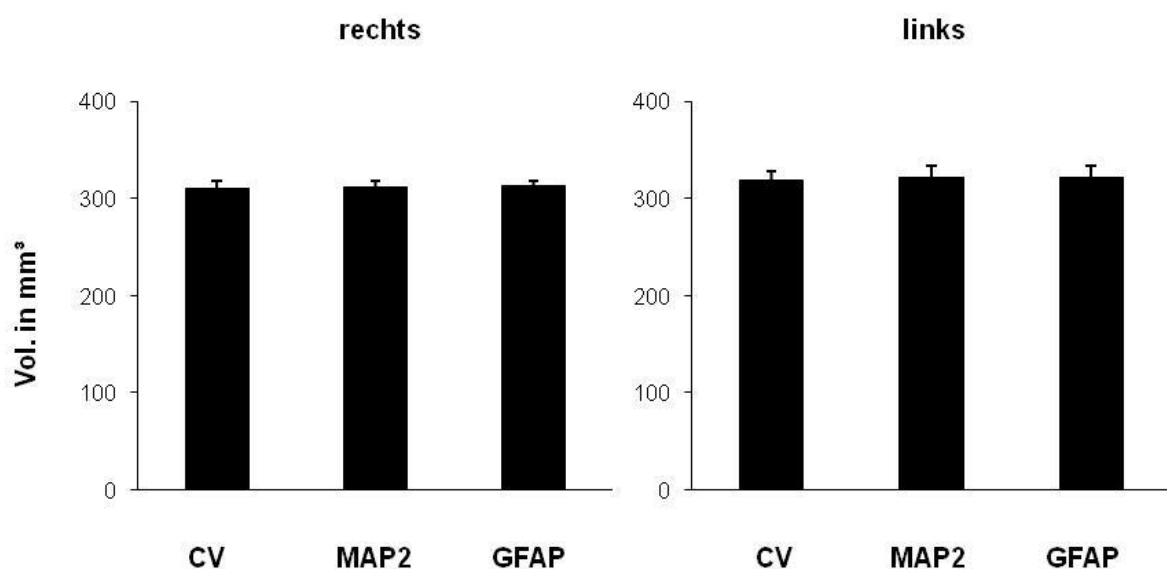


Abb. 2: Vergleich der rechten und linken Hemisphären-Größe (in mm³) der männlichen Sham-Tiere in Abhängigkeit von der Färbung. Beachte, die verwendete Färbung hatte keinen Einfluss auf das Messergebnis. (MW ± SEM)

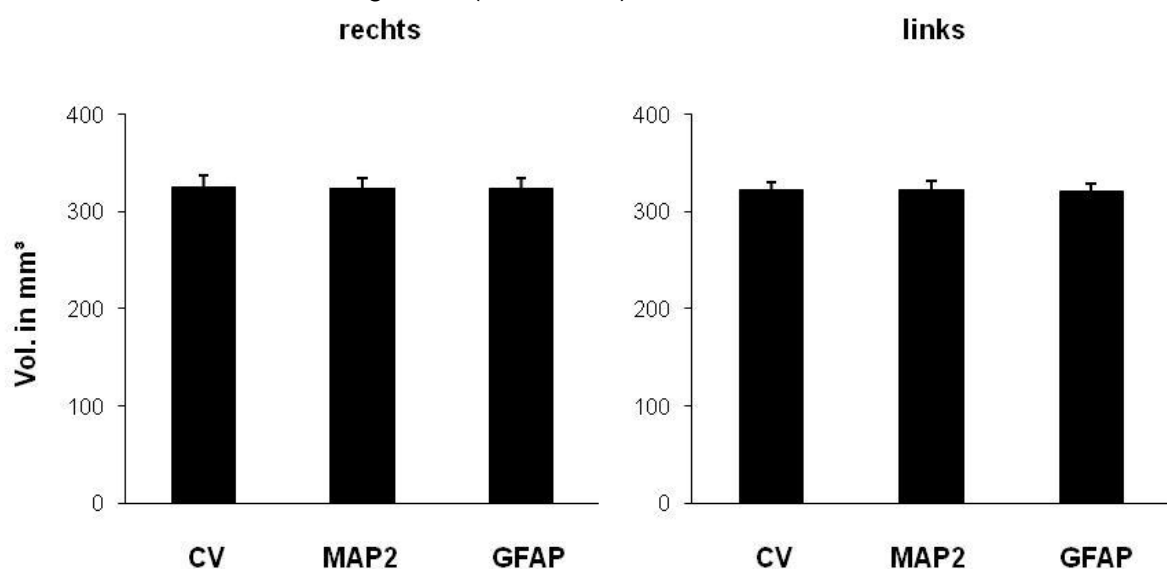


Abb. 3: Vergleich der rechten und linken Hemisphären-Größe (in mm³) der weiblichen Sham-Tiere in Abhängigkeit von der Färbung. Beachte, die verwendete Färbung hatte keinen Einfluss auf das Messergebnis. (MW ± SEM)

Die Größe der rechten und linken Hemisphäre unterschied sich sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Sham-Tieren nicht. Interessanterweise war auch die Hemisphären-Größe im Vergleich zwischen den Männchen und Weibchen nicht signifikant verschieden. Infolge dieser offensichtlichen Übereinstimmungen wurde von nun an keine geschlechtliche Differenzierung der Sham-Tiere getroffen, sondern vielmehr eine einheitliche Betrachtung dieser Gruppe unabhängig von ihrem Geschlecht vorgezogen. Es wurde eine durchschnittliche Volumen-Größe von $317,6 \pm 7,2 \text{ mm}^3$ für die rechte und $320,4 \pm 5,7 \text{ mm}^3$ für die linke Hemisphäre ermittelt, was wiederum keiner signifikanten Unterscheidung entspricht.

Weiterhin wurden die Ventrikel-Größe und das Volumen des Parenchyms bestimmt. Für die rechte Hemisphäre konnte ein mittleres Volumen des Ventrikels von $6,7 \pm 0,8 \text{ mm}^3$ ermittelt werden, wohingegen die linke Hemisphäre ein durchschnittliches Ventrikel-Volumen von $7,0 \pm 1,2 \text{ mm}^3$ aufwies, was letztendlich keinen signifikanten Unterschied darstellte. Ebenfalls nicht signifikant verschieden war das Volumen des rechten Parenchyms mit $310,8 \pm 8,0 \text{ mm}^3$ vom linken Parenchym mit $313,4 \pm 6,6 \text{ mm}^3$.

5.2.2 Inhomogenitäten der Färbungen

5.2.2.1 CV-Färbung

Die CV-Färbung war nicht vollständig homogen, das heißt es wurde eine regionsspezifische minimale Verringerung der CV-Anfärbbarkeit innerhalb beider Hemisphären der einzelnen Sham-Tiere sichtbar, die im Mittel ein Volumen in der rechten Hemisphäre von $17,9 \pm 3,3 \text{ mm}^3$ und in der linken Hemisphäre von $16,1 \pm 3,7 \text{ mm}^3$ umfasste. Die Färbungs-Inhomogenitäten traten in allen Sham-Tieren auf und zeigten sich in Form von leichten CV-Aufhellungen reproduzierbar in Teilen des Subkortex (vor allem im Caudoputamen), im Corpus callosum sowie in der Capsula externa (Abb. 4, Tab. 4). Diese reproduzierbaren Färbungs-Inhomogenitäten wurden bei der Bestimmung der Infarktgröße berücksichtigt.

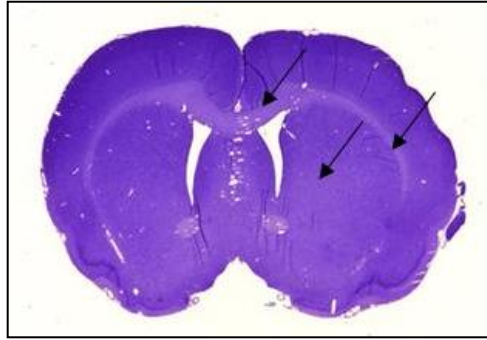


Abb. 4: Gehirn-Querschnitt eines Sham-Tieres in CV-Färbung, Bregma 1.00 mm, Interaural 10.00 mm. Beachte die beidseitigen, reproduzierbaren CV-Aufhellungen (Pfeile) in Teilen des Subkortex (Caudoputamen), Corpus callosum und Capsula externa.

5.2.2.2 MAP2-Färbung

Mit Hilfe der Sham-Tiere konnte das typische Verteilungsmuster der MAP2-IR nachvollzogen werden (Abb. 5). So stellte sich heraus, dass unter physiologischen Bedingungen, u.a. im Corpus callosum kaum MAP2-immunreaktive Strukturen vorzufinden waren (Tab. 4). Darüber hinaus konnten ebenfalls beidseitige, reproduzierbare MAP2-Inhomogenitäten in Teilen des Kortex (vor allem in den äußeren Schichten), im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen) und in der Capsula externa verzeichnet werden (Abb. 5, Tab. 4). Diese Inhomogenitäten betrafen ein Volumen von $87,4 \pm 5,8 \text{ mm}^3$ in der rechten und von $88,3 \pm 2,9 \text{ mm}^3$ in der linken Hemisphäre und wurden bei der Bestimmung der Infarktgröße berücksichtigt.

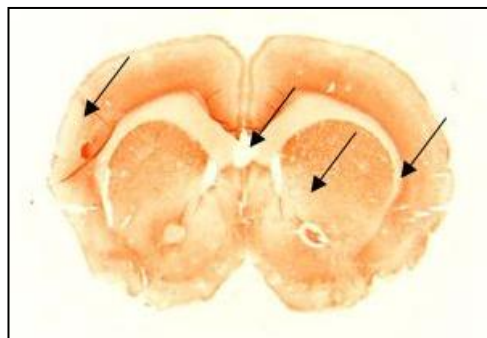


Abb. 5: Gehirn-Querschnitt eines Sham-Tieres in MAP2-Färbung, Bregma 1.00 mm, Interaural 10.00 mm. Beachte die beidseitigen, reproduzierbaren MAP2-Inhomogenitäten (Pfeile) in Teilen des Kortex (vor allem in den äußeren Schichten), im Corpus callosum, im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen) und in der Capsula externa.

5.2.2.3 GFAP-Färbung

Bei den Sham-Tieren zeigte sich eine gleichmäßige, durchschnittliche GFAP-IR von $35,1 \pm 1,5 \text{ mm}^3$ in der rechten und $35,6 \pm 2,3 \text{ mm}^3$ in der linken Hemisphäre. Diese Werte ergaben miteinander verglichen keinen signifikanten Unterschied. GFAP-positive Astrozyten waren vor allem in Teilen des Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum, sowie in der Capsula externa vorhanden (Abb. 6, Tab. 4).



Abb. 6: Gehirn-Querschnitt eines Sham-Tieres in GFAP-Färbung, Bregma 1.00 mm, Interaural 10.00 mm. GFAP-positive Astrozyten (Pfeile) waren beidseits in Teilen des Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum, sowie in der Capsula externa vorhanden.

Tab. 4: Inhomogenitäten der 3 verschiedenen Färbungen innerhalb der männlichen und weiblichen Sham-Tiere.

Geschlecht & Tier-Nr.	Inhomogenitäten in CV	Inhomogenitäten in MAP2	GFAP-Markierung
Männlich			
161	Aufhellung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Abschwächung beidseits: Teile des Kortex, Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Markierung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa
162	Aufhellung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Abschwächung beidseits: Teile des Kortex, Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Markierung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa
163	Aufhellung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Abschwächung beidseits: Teile des Kortex, Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Markierung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa
Weiblich			
157	Aufhellung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Abschwächung beidseits: Teile des Kortex, Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Markierung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa
159	Aufhellung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Abschwächung beidseits: Teile des Kortex, Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Markierung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa
160	Aufhellung beidseits: Teile des Kortex, Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Abschwächung beidseits: Teile des Kortex, Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa	Markierung beidseits: Subkortex, Corpus callosum, Capsula externa

5.3 Ischämische Hirnschädigung und Effekte von Dexamethason

5.3.1 Infarktgröße in der CV-Färbung

Anhand des CV-Färbungsverlustes war es möglich das Areal untergegangener Neurone, entsprechend dem Infarktkern, nachzuweisen. Um das Infarktvolumen der ischämischen Hemisphäre, welches sich wie die Färbungs-Inhomogenitäten als Aufhellung darstellte, bestimmen zu können, wurden die Inhomogenitäten der kontralateralen Seite subtrahiert. Bei den Sham-Tieren war kein Infarkt sichtbar. Die MCAO induzierte sowohl in den Kontrollgruppen als auch in den mit DM-vorbehandelten Ratten einen reproduzierbaren Infarkt variabler Größe und Ausdehnung in der ischämischen Hemisphäre, vor allem in Regionen des lateralen Caudoputamen sowie in Teilen des frontoparietalen Kortex, wobei besonders der frontoparietale somatosensorische Kortex (CX-2 und CX-3) betroffen war (Abb. 7 und 8, siehe 6.1.3, Abb. 45). Die infarzierten Regionen reichten in ihrer maximalen Spanne von der Bregma-Ebene 3,20 mm bis hin zur Bregma-Ebene -5,80 mm, wobei sich jedoch eine gewisse Varianz hinsichtlich des Volumens der Infarkte abzeichnete. Demnach ließ sich bei 4 weiblichen (davon eine mit DM-vorbehandelte Ratte sowie 3 Kontrolltiere) und 3 männlichen (jeweils Kontrolltiere) Versuchstieren kein deutlicher Infarktbereich abgrenzen, währenddessen die übrigen Ratten in der Größe und Lokalisation relativ gleichmäßige Infarkte zeigten, die neben dem lateralen Caudoputamen und dem frontoparietalen Kortex auch den Hippokampus, die Capsula externa und das Corpus callosum betrafen. Sowohl in den Kontrolltieren als auch in den mit DM-vorbehandelten Ratten war in der kontralateralen Hemisphäre kein Infarkt nachweisbar.

Des Weiteren wiesen die männlichen mit DM-vorbehandelten Ratten ein signifikant größeres Infarktvolumen auf als die männlichen Kontrolltiere ($p \leq 0,05$, Abb. 9). Auch die weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten zeigten die Tendenz eines größeren Infarktvolumens im Vergleich zu den weiblichen Kontrolltieren (Abb. 9).

Während die männlichen und weiblichen Kontrolltiere keine Unterschiede in Bezug auf das Infarktvolumen zwischen den Geschlechtern aufwiesen (Abb. 10), konnte bei der mit DM-vorbehandelten Gruppe ein tendenziell größeres Infarktvolumen bei den männlichen im Vergleich zu den weiblichen Ratten beobachtet werden (Abb. 10).

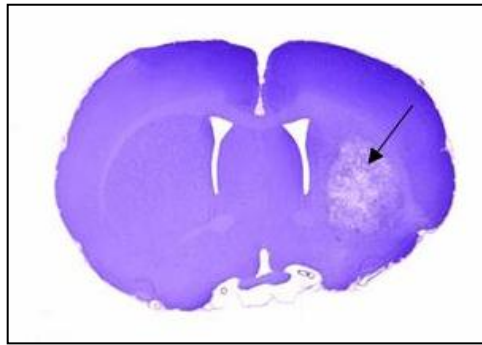


Abb. 7: Gehirn-Querschnitt eines männlichen Kontrolltieres in CV-Färbung, Bregma 1,60 mm, Interaural 10.60 mm. Beachte den Infarkt (Pfeil) in Teilen des Kortex und im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen) innerhalb der ischämischen linken Hemisphäre.

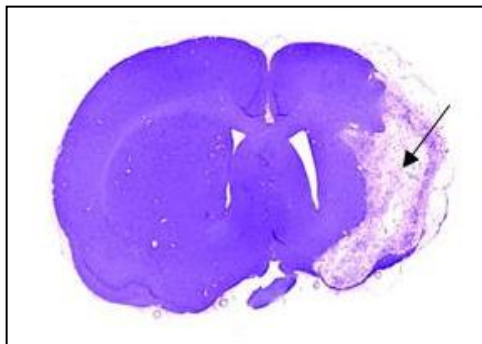


Abb. 8: Gehirn-Querschnitt eines männlichen mit DM-vorbehandelten Tieres in CV-Färbung, Bregma 1,60 mm, Interaural 10.60 mm. Beachte den Infarkt (Pfeil) in Teilen des Kortex, im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum und in der Capsula externa innerhalb der ischämischen linken Hemisphäre.

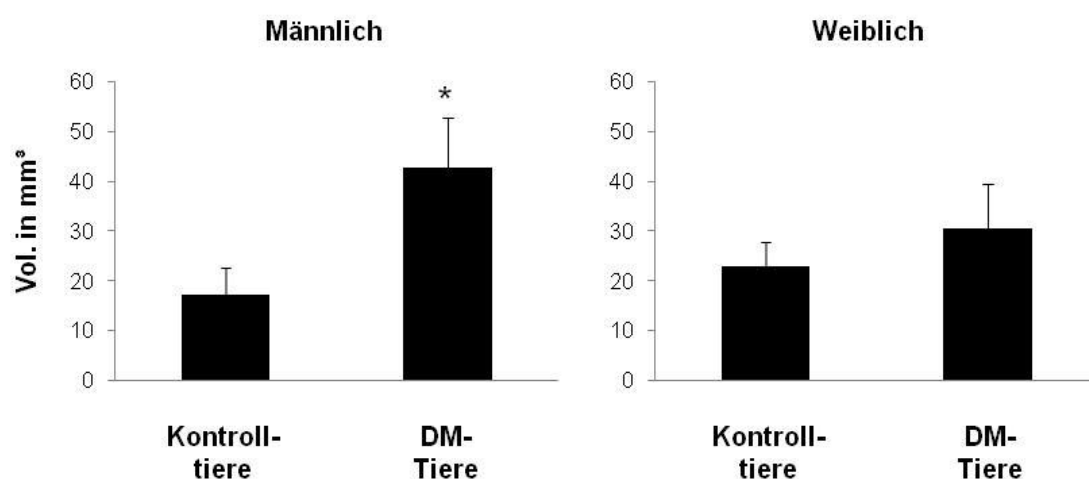


Abb. 9: Effekte von DM auf die Infarktgröße in mm³, anhand der CV-Färbung bei den männlichen und weiblichen Tieren. Beachte das signifikant größere Infarktvolumen bei den männlichen DM-Tieren im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren. (* $p \leq 0,05$, MW \pm SEM)

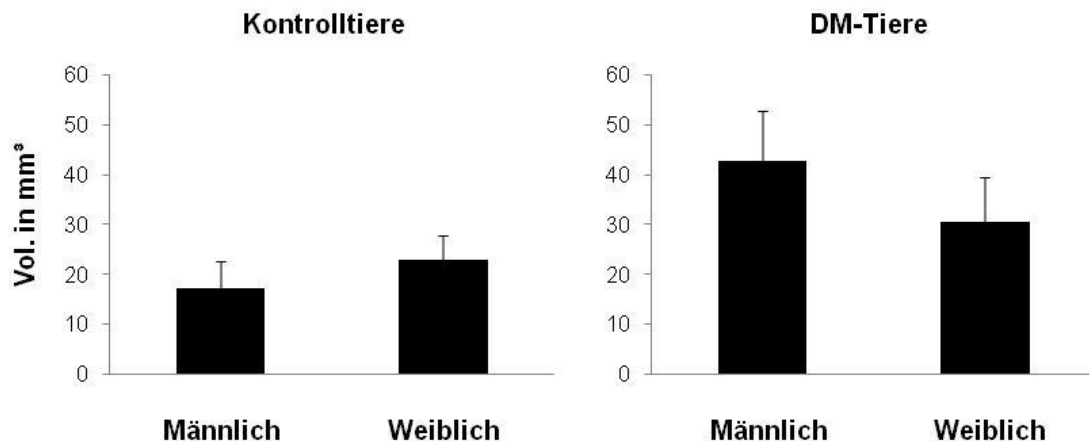


Abb. 10: Vergleich der Infarktgröße in mm³, anhand der CV-Färbung zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht. (MW ± SEM)

5.3.2 Infarktgröße in der MAP2-Färbung

Mit Hilfe des Verlustes der MAP2-IR war es möglich, das Areal der untergegangenen und funktionslosen Zellen innerhalb der ischämischen Hemisphäre zu bestimmen. Bei den Sham-Tieren war neben den bereits beschriebenen MAP2-Inhomogenitäten (siehe 5.2.2.2) kein Infarkt nachweisbar. Die MCAO induzierte sowohl in den Kontrolltieren als auch in den mit DM-vorbehandelten Tieren einen reproduzierbaren Verlust der MAP2-IR, vor allem in Teilen des Kortex (insbesondere in den äußeren Schichten) und Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum und in der Capsula externa (Abb. 11 und 12). Sowohl in den Kontrolltieren als auch in den mit DM-vorbehandelten Ratten war in der kontralateralen Hemisphäre kein Infarkt nachweisbar.

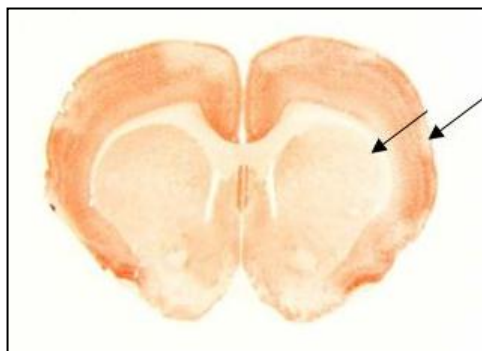


Abb. 11: Gehirn-Querschnitt eines männlichen Kontrolltieres in MAP2-Färbung, Bregma 1.60 mm, Interaural 10.60 mm. Beachte den Verlust der MAP2-IR (Pfeile) in Teilen des Kortex und im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen) innerhalb der ischämischen linken Hemisphäre.

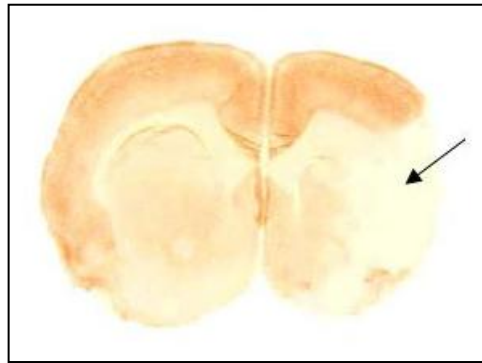


Abb. 12: Gehirn-Querschnitt eines männlichen mit DM-vorbehandelten Tieres in MAP2-Färbung, Bregma 1.60 mm, Interaural 10.60 mm. Beachte den Verlust der MAP2-IR (Pfeil) in Teilen des Kortex, im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum und in der Capsula externa innerhalb der ischämischen linken Hemisphäre.

Die männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten wiesen einen signifikant größeren MAP2-Verlust auf als die jeweiligen Kontrolltiere ($p \leq 0,05$, Abb. 13). Bei dem Vergleich der fehlenden MAP2-IR zwischen den Geschlechtern ließ sich bei den Kontrolltieren wie auch bei den mit DM-vorbehandelten Tieren kein Unterschied zwischen den Männchen und Weibchen feststellen (Abb. 14).

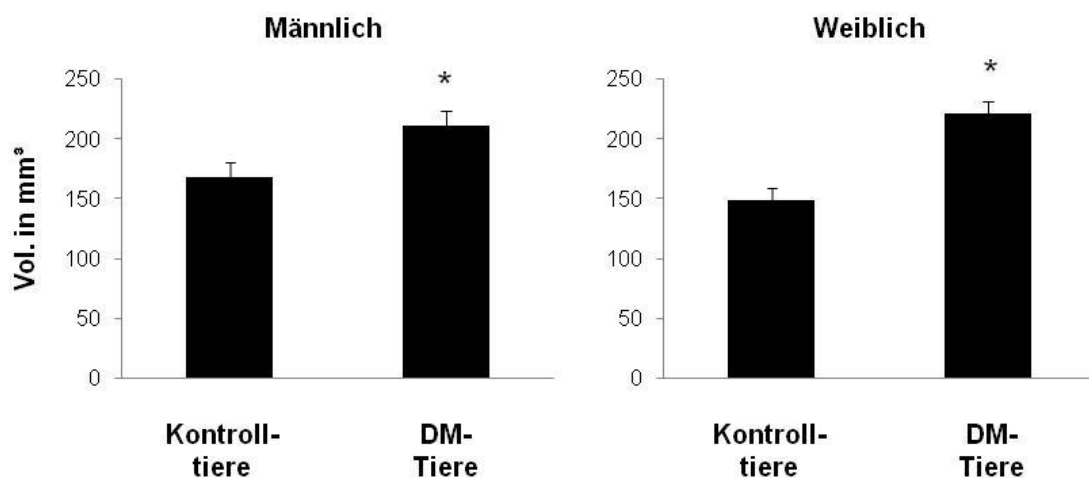


Abb. 13: Effekte von DM auf das Volumen untergegangener und funktionsloser Zellen, dargestellt als Verlust der MAP2-IR (in mm³) bei den männlichen und weiblichen Tieren. Beachte den signifikant größeren MAP2-Verlust innerhalb der mit DM vorbehandelten Ratten. (* $p \leq 0,05$, MW \pm SEM)

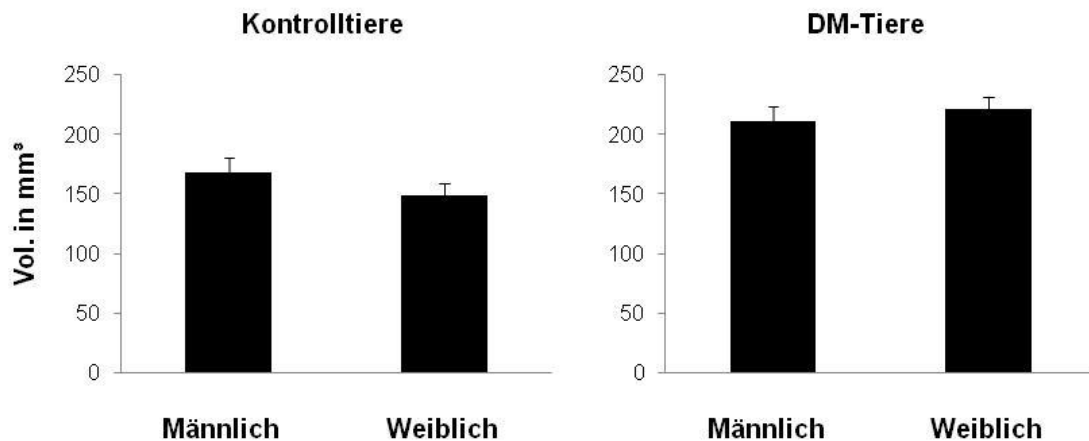


Abb. 14: Einfluss des Geschlechts auf das Volumen untergegangener und funktionsloser Zellen, anhand des Verlusts der MAP2-IR (in mm³). (MW \pm SEM)

5.3.3 Infarktgröße in der GFAP-Färbung

Anhand der GFAP-IR war es möglich, reaktive Astrozyten zu detektieren. Diese GFAP-positiven Astrozyten waren in allen Versuchsgruppen, einschließlich der Gruppe der Sham-Tiere (5.2.2.3), vor allem in Teilen des Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum sowie in der Capsula externa reproduzierbar vorhanden (Abb. 15 und 16). Da im nekrotischen Infarktkern die Astrozyteninfiltration fehlte, entsprach das Volumen der GFAP-Markierung nicht der Infarktgröße. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung der Größe der Infarktnarbe in den einzelnen Schnitten zu der Fläche der mit der GFAP-Markierung dargestellten Astrozytose die Fläche des Infarktkerns (CV-Verlust) aufsummiert.

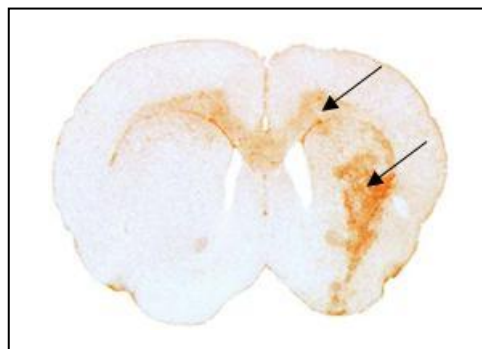


Abb. 15: Gehirn-Querschnitt eines männlichen Kontrolltieres in GFAP-Färbung, Bregma 1.60 mm, Interaural 10.60 mm. Beachte GFAP-positive Astrozyten (Pfeile) in Teilen des Kortex, im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen) und im Corpus callosum innerhalb der ischämischen linken Hemisphäre.

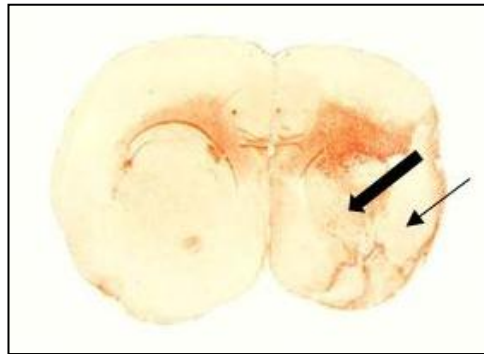


Abb. 16: Gehirn-Querschnitt eines männlichen mit DM-vorbehandelten Tieres in GFAP-Färbung, Bregma 1.60 mm, Interaural 10.60 mm. Beachte GFAP-positive Astrozyten (dicker Pfeil) in Teilen des Kortex, im Subkortex (insbesondere im Caudoputamen) und im Corpus callosum, sowie das Areal des Infarktkerns mit fehlenden GFAP-positiven Astrozyten (dünner Pfeil).

Bei den Sham-Tieren war wiederum kein Infarkt nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Kontrolltieren und den mit DM-vorbehandelten Ratten das Vorhandensein der Infarktnarbe, dargestellt durch GFAP-positive Astrozyten, reproduzierbar in Teilen des Kortex und Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum und in der Capsula externa, insgesamt vor allem im Randbereich des eigentlichen Infarktkerns (Abb. 15 und 16).

In beiden Geschlechtern waren tendenziell mehr GFAP-positive Astrozyten bei den mit DM-vorbehandelten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren zu finden (Abb. 17). Im Vergleich zwischen den Geschlechtern waren bei beiden Gruppen tendenziell mehr reaktive Astrozyten bei den männlichen als bei den weiblichen Ratten zu beobachten (Abb. 18).

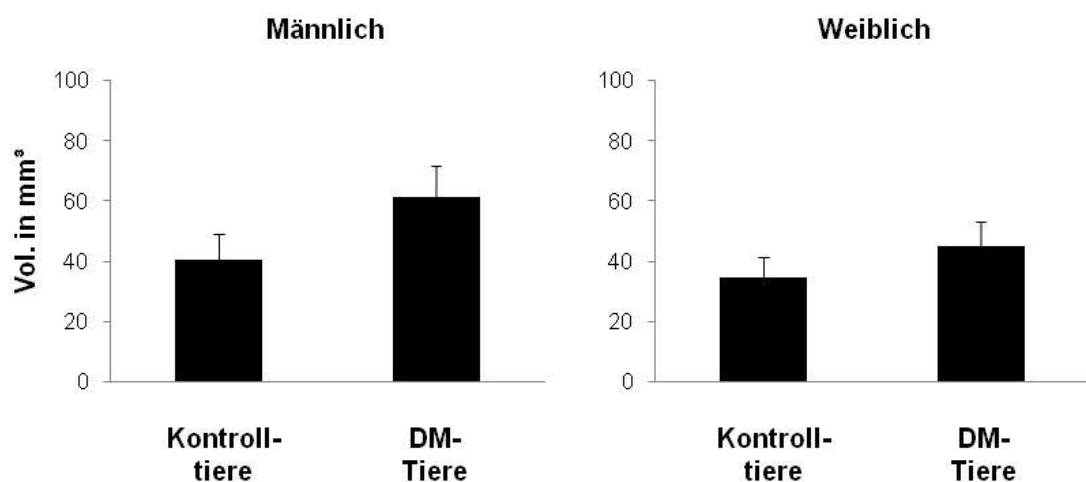


Abb. 17: Effekte von DM auf das Volumen GFAP-positiver Astrozyten (in mm³) bei den männlichen und weiblichen Tieren. (MW ± SEM)

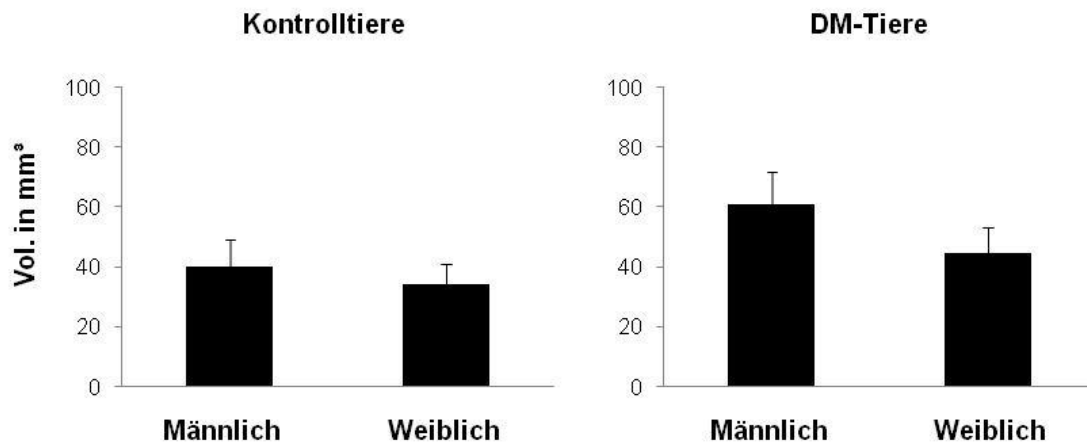


Abb. 18: Einfluss des Geschlechts auf das Volumen GFAP-positiver Astrozyten (in mm³). (MW ± SEM)

Interessanterweise war bei den mit DM-vorbehandelten Weibchen und Männchen in der nicht-ischämischen Hemisphäre weniger Astroglia bzw. GFAP-positive Astrozyten nachweisbar als bei den jeweiligen Sham- und Kontrolltieren ($p \leq 0,05$, Abb. 19). Daneben zeigte sich auch eine verringerte GFAP-IR innerhalb der nicht-ischämischen Hemisphäre bei den weiblichen Kontrolltieren im Vergleich zu den Sham-Tieren ($p \leq 0,05$, Abb. 19).

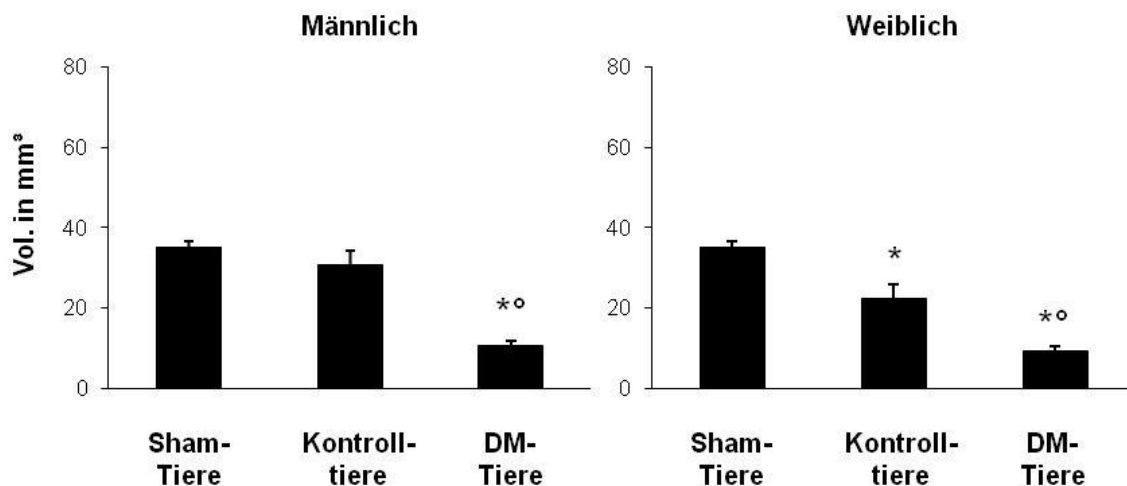


Abb. 19: Vergleich des Volumens des Gewebes mit GFAP-positiven Astrozyten (in mm³) in der nicht-ischämischen Hemisphäre. Beachte die geringere GFAP-IR der männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten sowie der weiblichen Kontrolltiere. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Kontrolltieren, MW ± SEM)

5.3.4 Vergleich der Infarktgröße in den verschiedenen Markierungen

Im direkten Vergleich zwischen der CV-, MAP2- und der GFAP-Färbung, das heißt im Vergleich des Infarktkerns, der Summe aus Infarktkern und Penumbra und der Infarktnarbe wurde sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit DM-vorbehandelten Tieren zunächst ein deutlich erhöhter MAP2-Verlust sowie das Vorhandensein tendenziell mehr GFAP-positiver Astrozyten im Vergleich zum CV-Verlust deutlich ($p \leq 0,05$, Abb. 20). Der MAP2-Verlust als Ausdruck der Penumbra war signifikant größer als das Volumen des Infarktkerns (CV-Verlust) und der Infarktnarbe (GFAP-Markierung) ($p \leq 0,05$, Abb. 20).

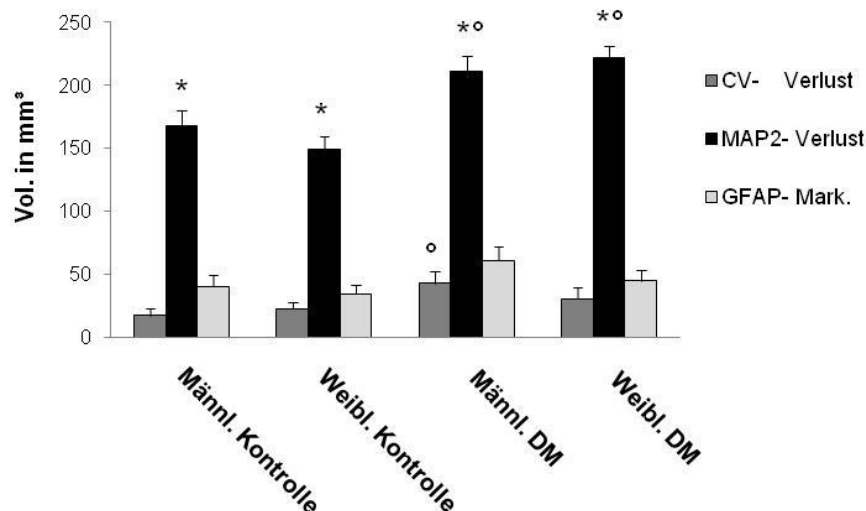


Abb. 20: Vergleich des Infarktvolumens (in mm³) in CV-, GFAP- und MAP2-Färbung. Beachte in allen Gruppen den signifikant größeren Verlust der MAP2-IR im Vergleich zum CV-Verlust und dem Vorhandensein GFAP-positiver Astrozyten. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich von MAP2-Verlust zu CV-Verlust und GFAP-Markierung, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM zu den Kontrolltieren, MW \pm SEM)

Sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Ratten war die Tendenz eines größeren Infarktkerns (CV-Färbung) und Infarktnarbe (GFAP-Färbung) bei den mit DM-vorbehandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren erkennbar (Abb. 20). Währenddessen waren der Infarktkern und die Penumbra (MAP2-Färbung) bei den männlichen und weiblichen und der Infarktkern (CV-Färbung) bei den männlichen mit DM-vorbehandelten Ratten signifikant größer als bei den Kontrolltieren ($p \leq 0,05$, Abb. 20).

5.4 Hemisphären-Größe und Effekte von Dexamethason

Es war eine größere nicht-ischämische Hemisphäre in der CV-Färbung bei den männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten erkennbar als bei den Sham-Tieren ($p \leq 0,05$, Abb. 21 und 22).

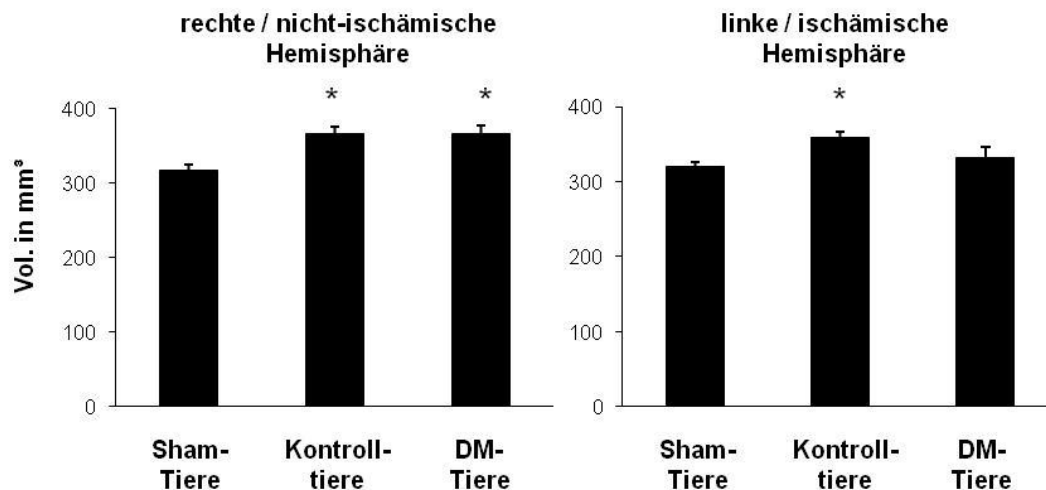


Abb. 21: Vergleich der Hemisphären-Größe (in mm³) zwischen den männlichen Tieren. Beachte die vergrößerte, nicht-ischämische Hemisphäre der Kontrolltiere und der mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren sowie die signifikant größere ischämische Hemisphäre der Kontrolltiere. (* $p \leq 0,05$, MW \pm SEM)

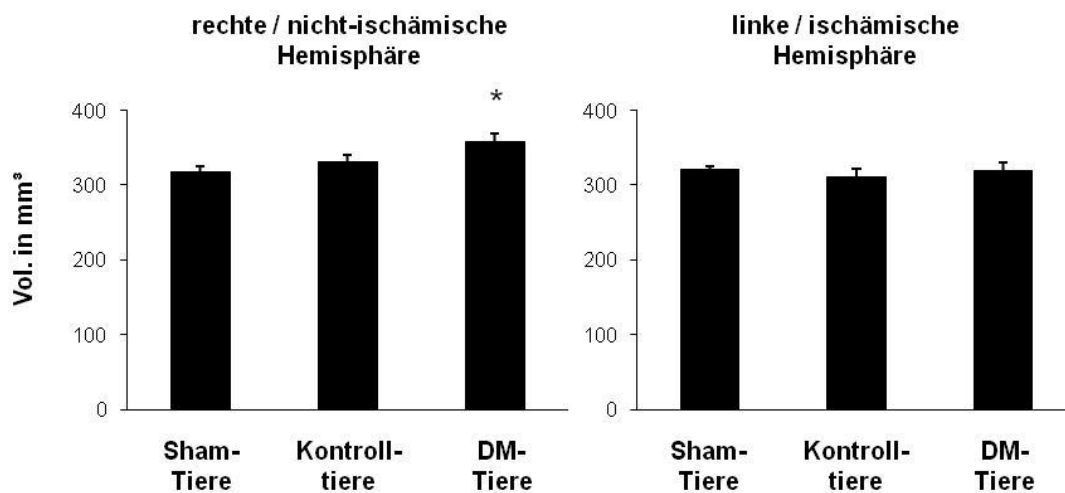


Abb. 22: Vergleich der Hemisphären-Größe (in mm³) zwischen den weiblichen Tieren. Beachte die vergrößerte, nicht-ischämische Hemisphäre der mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren. (* $p \leq 0,05$, MW \pm SEM)

Gleichermaßen war bei den männlichen Kontrolltieren, aber nicht bei den mit DM-vorbehandelten Tieren sowohl die nicht-ischämische als auch die ischämische Hemisphäre vergrößert ($p \leq 0,05$, Abb. 21).

Beim Vergleich der Hemisphären-Größe zwischen den Geschlechtern waren bei den weiblichen Kontroll-, aber nicht bei den mit DM-vorbehandelten Tieren beide, die nicht-ischämische sowie die ischämische Hemisphäre kleiner im Vergleich zu den männlichen Kontrolltieren ($p \leq 0,05$, Abb. 23 und 24).

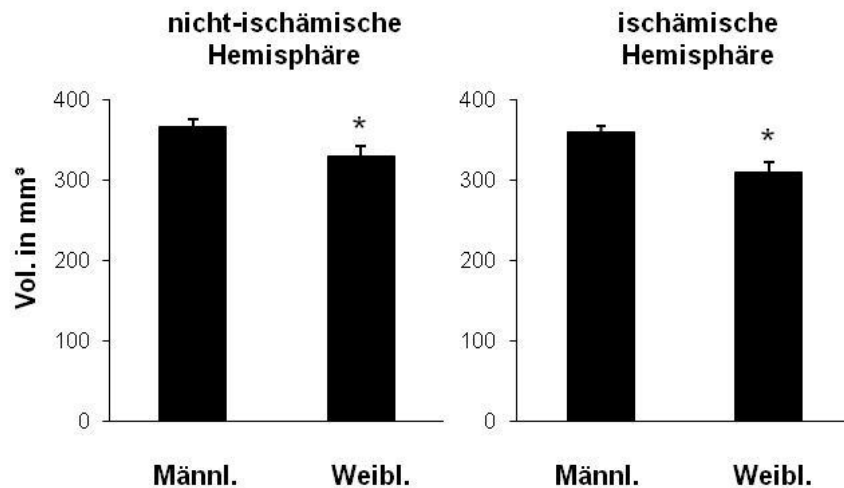


Abb. 23: Hemisphären-Größe (in mm³) im Vergleich zwischen den männlichen und weiblichen Kontrolltieren. Beachte die signifikant kleinere nicht-ischämische und ischämische Hemisphäre der weiblichen Tiere. (* $p \leq 0,05$, MW \pm SEM)

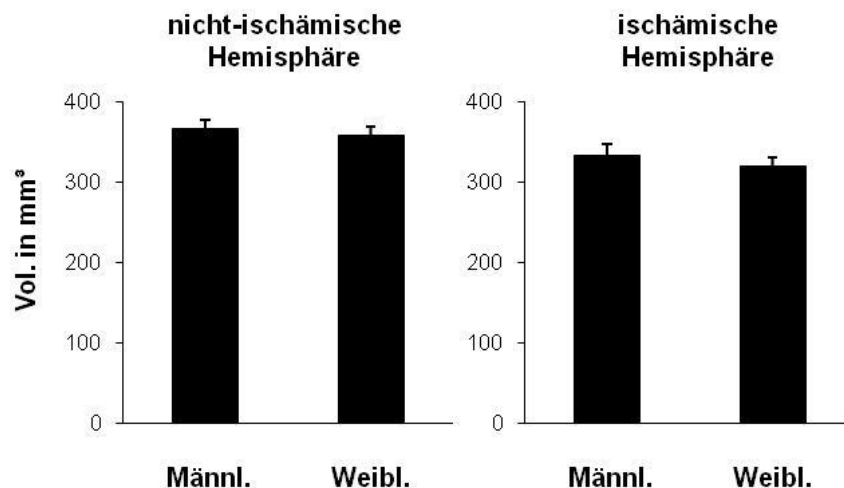


Abb. 24: Hemisphären-Größe (in mm³) der männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Tiere. (MW \pm SEM)

5.5 Hippokampale Schädigung und Effekte von Dexamethason

5.5.1 Hippokampale Schädigung in der CV-Färbung

Um nachfolgend die Auswirkungen von DM auf den gegenüber einer Ischämie besonders vulnerablen Hippokampus beurteilen zu können, wurde innerhalb dessen

einzelnen Regionen das Ausmaß der nekrotischen Zelluntergänge anhand der CV-Färbung mikroskopisch analysiert (Abb. 25).

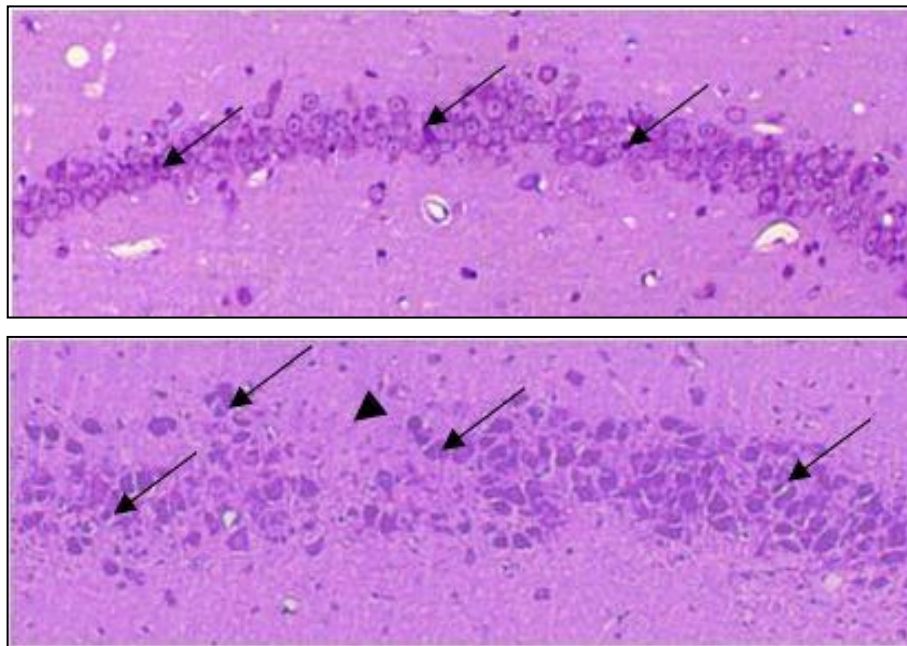


Abb. 25: Nekrotische Zelluntergänge (Pfeile) innerhalb der CA1-Region des Hippokampus einer männlichen Kontroll- (oben) und mit DM-vorbehandelten Ratte (unten). Deutlich werden die vermehrten nekrotischen Zelluntergänge (Pfeile) und die fehlenden, bereits abgeräumten Neurone (Pfeilspitze) bei der mit DM-vorbehandelten Ratte. (Bregma: -3,80 mm, Interaural: 5,20 mm, Vergrößerung: 25x)

Sowohl im Subiculum als auch im inneren und äußeren Blatt des Gyrus dentatus ließ sich zwischen den Gruppen kein Unterschied feststellen, weder innerhalb der nicht-ischämischen noch innerhalb der ischämischen Hemisphäre (Abb. 26, 27 und 28).

Demgegenüber waren im Bereich der CA1- und CA2- sowie in der CA3-Region der ischämischen Hemisphäre bei den männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Tieren deutlich mehr nekrotische Zelluntergänge im Vergleich zu den Sham- und Kontrolltieren zu finden ($p \leq 0,05$, Abb. 29 und 30). Ähnlich verhielt es sich bei den männlichen Kontrolltieren, die in dieser Region ebenfalls deutlich mehr nekrotische Zelluntergänge als die Sham-Tiere zeigten ($p \leq 0,05$, Abb. 29 und 30). Im Gegensatz dazu war in der nicht-ischämischen Hemisphäre wiederum kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar (Abb. 29 und 30).

In Hinblick auf die nekrotischen Zelluntergänge innerhalb der CA4-Region des Hippokampus war eine Zunahme lediglich bei den weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren ersichtlich ($p \leq 0,05$, Abb. 31). Darüber hinaus waren keine Gruppenunterschiede zu ermitteln (Abb. 31).

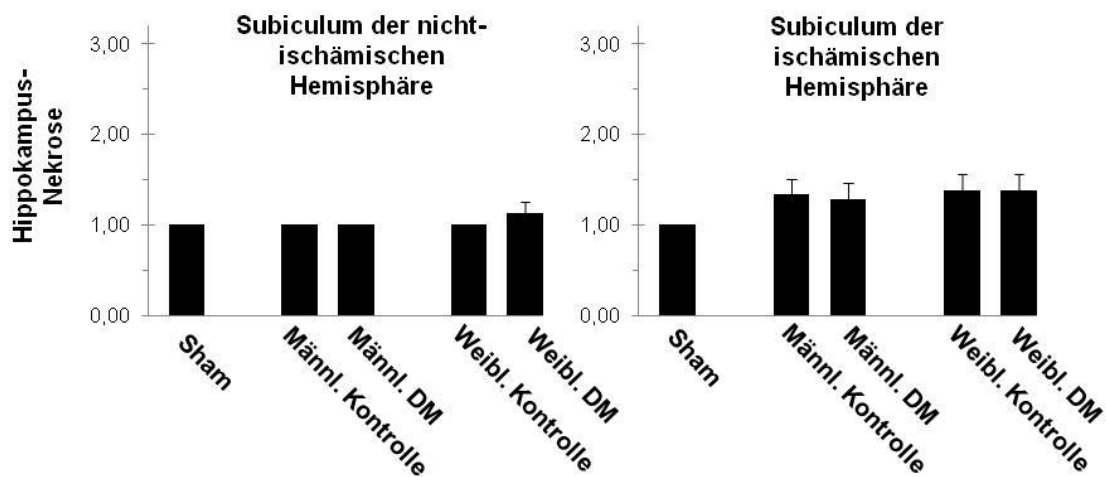


Abb. 26: Nekrotische Zellen im Subiculum der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% nekrotische Zelluntergänge, 2,00: 10-50% nekrotische Zelluntergänge, 3,00: >50-90% nekrotische Zelluntergänge. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. (MW±SEM)

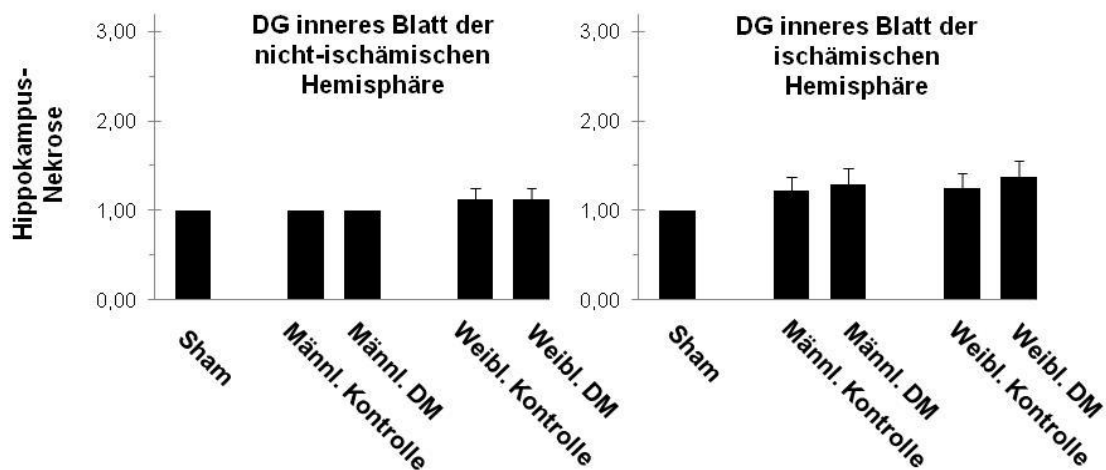


Abb. 27: Nekrotische Zellen im inneren Blatt des Gyrus dentatus (DG) der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% nekrotische Zelluntergänge, 2,00: 10-50% nekrotische Zelluntergänge, 3,00: >50-90% nekrotische Zelluntergänge. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. (MW±SEM)

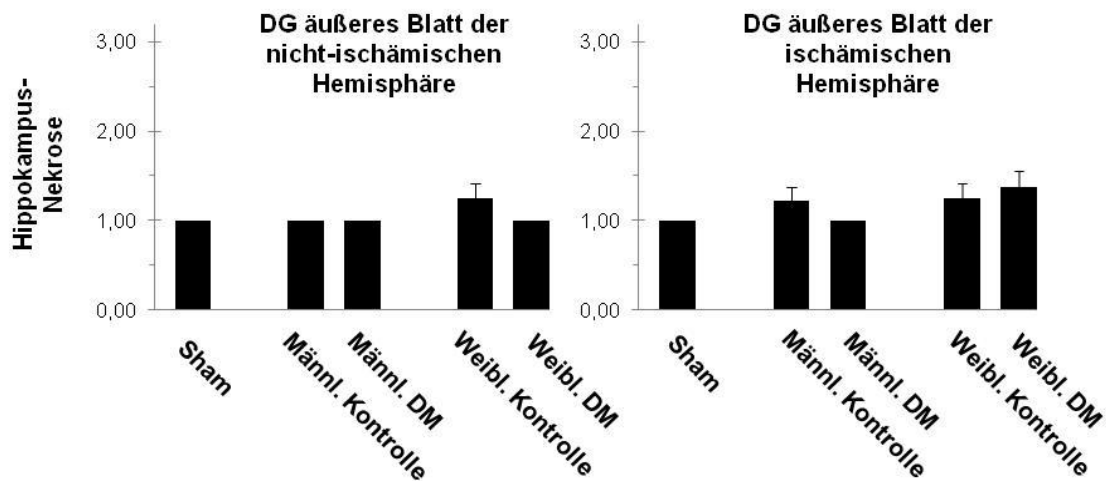


Abb. 28: Nekrotische Zellen im äußeren Blatt des Gyrus dentatus (DG) der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% nekrotische Zelluntergänge, 2,00: 10-50% nekrotische Zelluntergänge, 3,00: >50-90% nekrotische Zelluntergänge. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. (MW±SEM)

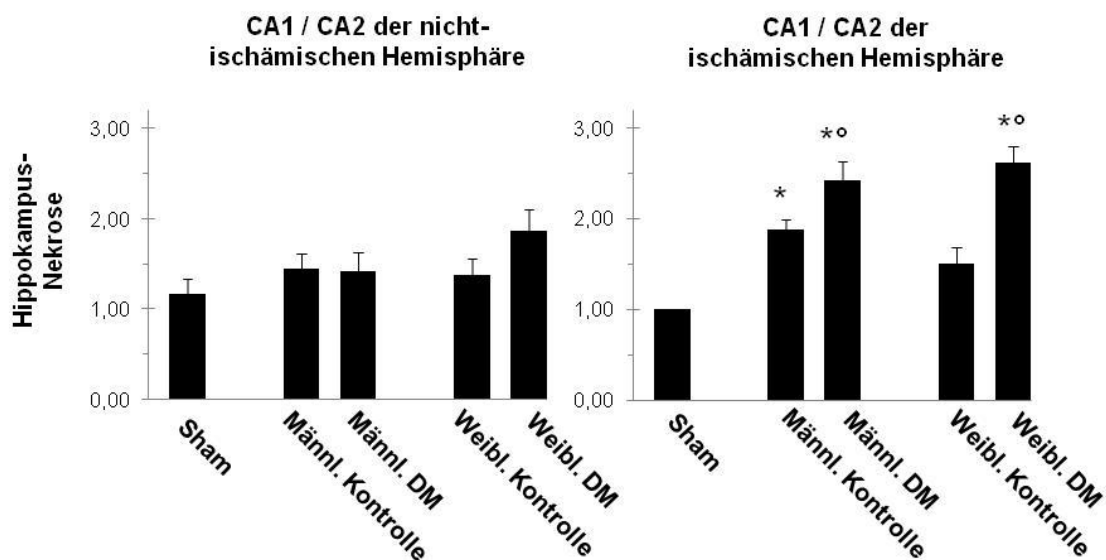


Abb. 29: Nekrotische Zellen in der CA1- und CA2-Region der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% nekrotische Zelluntergänge, 2,00: 10-50% nekrotische Zelluntergänge, 3,00: >50-90% nekrotische Zelluntergänge. Beachte die signifikant erhöhte Nekrose sowohl der männlichen Kontrolltiere als auch der männlichen und weiblichen DM-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren innerhalb der ischämischen Hemisphäre. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM- zu den Kontroll-Tieren, MW±SEM)

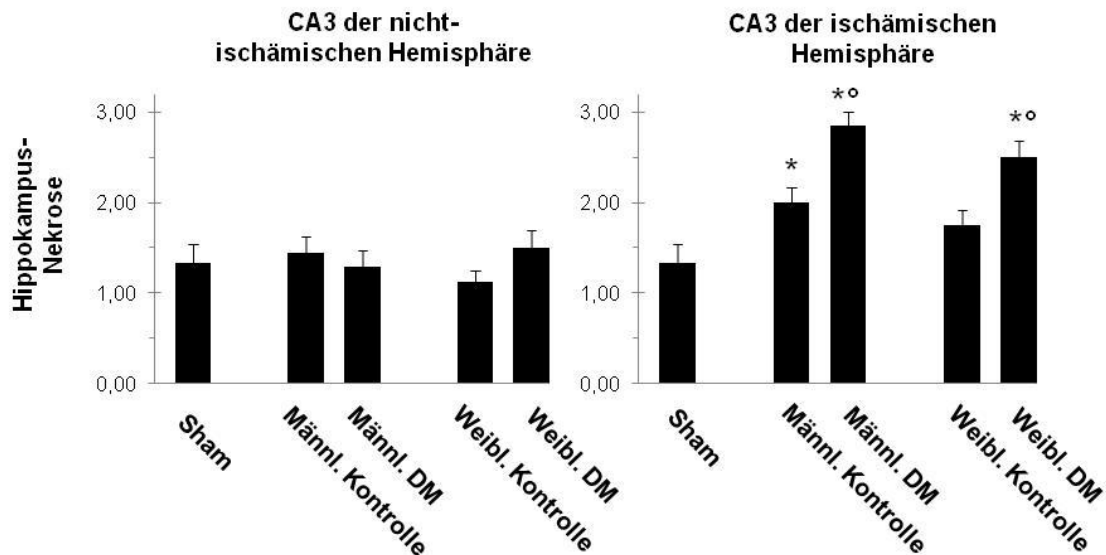


Abb. 30: Nekrotische Zellen in der CA3-Region der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% nekrotische Zelluntergänge, 2,00: 10-50% nekrotische Zelluntergänge, 3,00: >50-90% nekrotische Zelluntergänge. Beachte die signifikant erhöhte Nekrose sowohl der männlichen Kontrolltiere als auch der männlichen und weiblichen DM-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren innerhalb der ischämischen Hemisphäre. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM- zu den Kontroll-Tieren, MW \pm SEM)

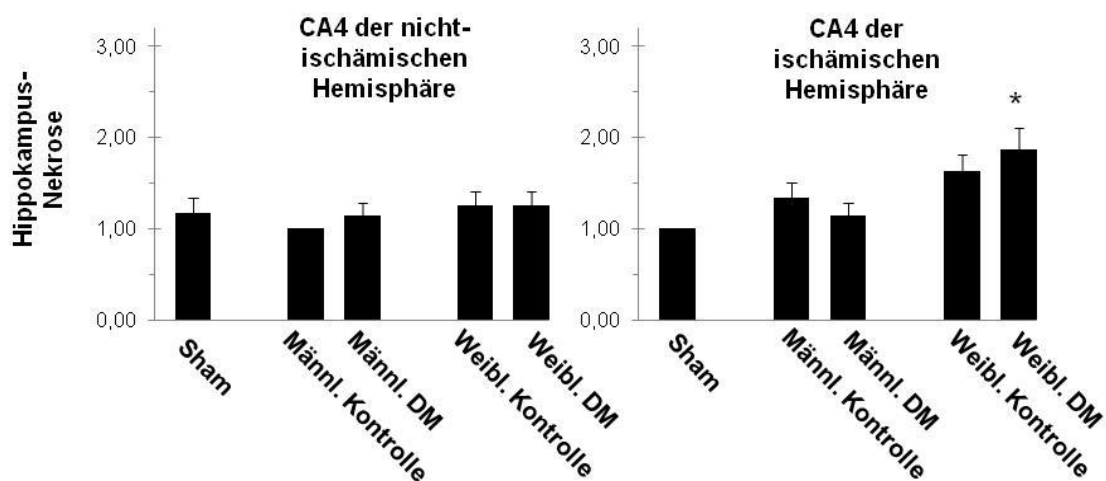


Abb. 31: Nekrotische Zellen in der CA4-Region der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% nekrotische Zelluntergänge, 2,00: 10-50% nekrotische Zelluntergänge, 3,00: >50-90% nekrotische Zelluntergänge. Beachte die signifikant erhöhte Nekrose der weiblichen DM-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren innerhalb der ischämischen Hemisphäre. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, MW \pm SEM)

5.5.2 Hippokampale Schädigung in der MAP2-Färbung

Zur Bestimmung des Ausmaßes der nekrotischen Zelluntergänge und der Penumbra im Hippokampus wurden die prozentualen Längen der MAP2-Abschwächung im

Verhältnis zur Gesamtlänge der jeweiligen Regionen mikroskopisch analysiert (Abb. 32).

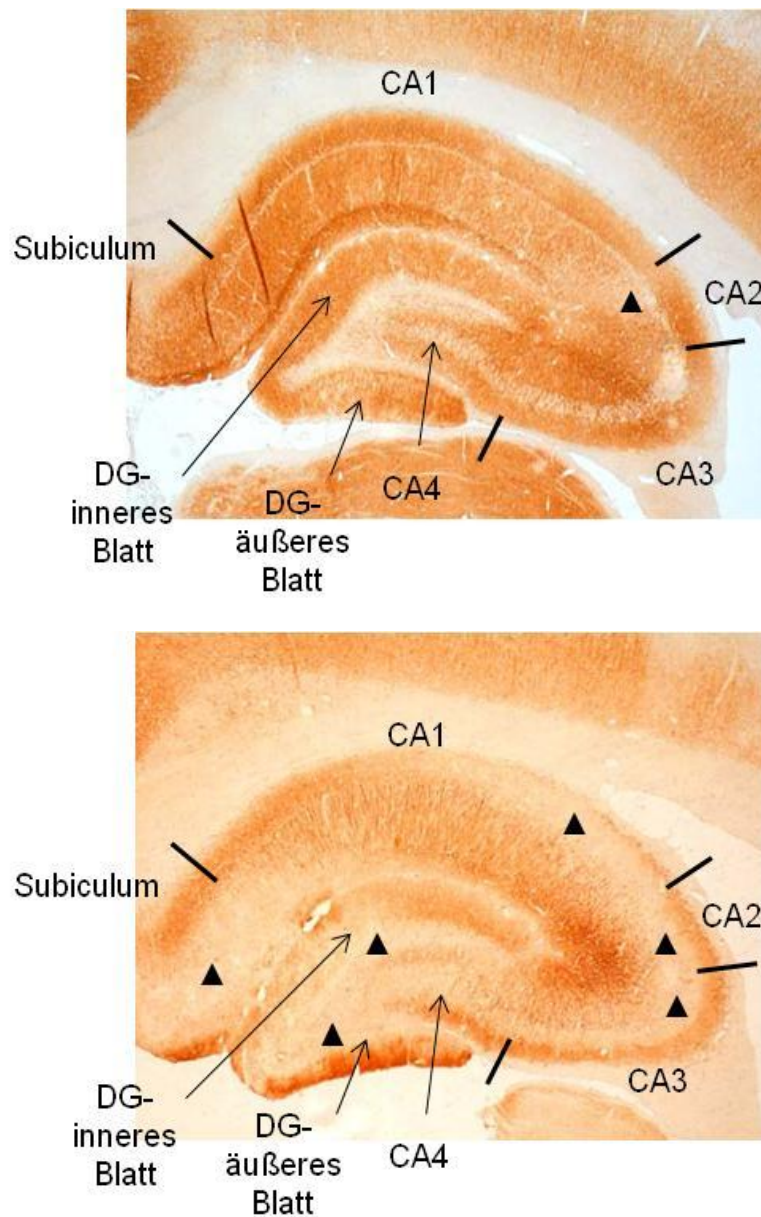


Abb. 32: MAP2-IR des Hippokampus einer männlichen Kontroll- und mit DM-vorbehandelten Ratte. Deutlich wird der ausgeprägtere MAP2-Verlust (Pfeilspitzen) bei der mit DM-vorbehandelten Ratte innerhalb der CA1/CA2- und CA3-Region (statistisch signifikant) und in der CA4-Region, im Subiculum sowie im inneren und äußeren Blatt des Gyrus dentatus (DG) (statistisch nicht signifikant). (Bregma: -3,80 mm, Interaural: 5,20 mm, Vergrößerung: 4x)

Lediglich im Subiculum ließ sich zwischen den Gruppen kein Unterschied feststellen, weder innerhalb der nicht-ischämischen noch innerhalb der ischämischen Hemisphäre (Abb. 33).

Demgegenüber war im Bereich der CA1- und CA2- sowie in der CA3-Region der ischämischen Hemisphäre bei den männlichen und weiblichen mit DM-

vorbehandelten Tieren eine deutlich größere MAP2-Abschwächung im Vergleich zu den Sham- und Kontrolltieren zu finden ($p \leq 0,05$, Abb. 34 und 35). Ähnlich verhielt es sich bei den männlichen Kontrolltieren, die in dieser Region ebenfalls eine deutlich verringerte MAP2-IR als die Sham-Tiere zeigten ($p \leq 0,05$, Abb. 34 und 35). Im Gegensatz dazu war in der nicht-ischämischen Hemisphäre wiederum kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar (Abb. 34 und 35).

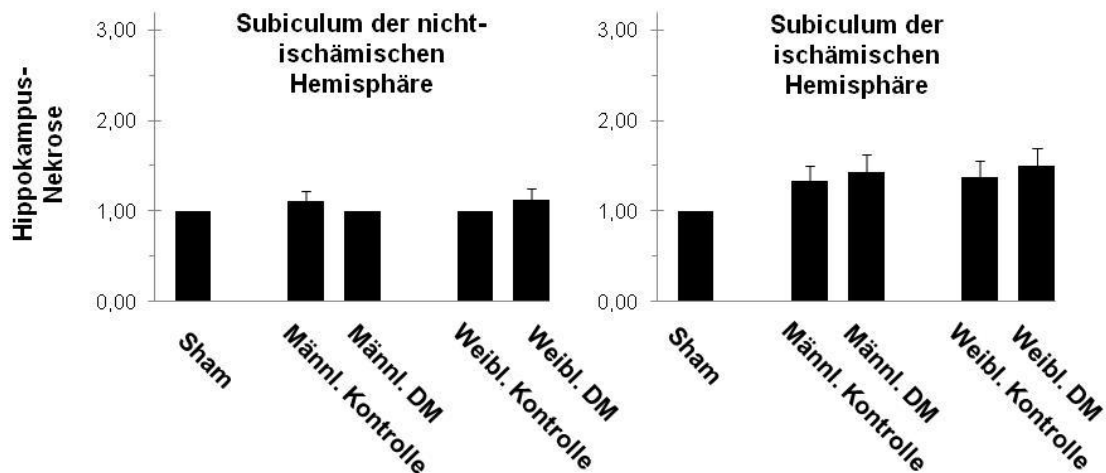


Abb. 33: MAP2-Verlust im Subiculum der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% MAP2-Verlust. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. (MW \pm SEM)

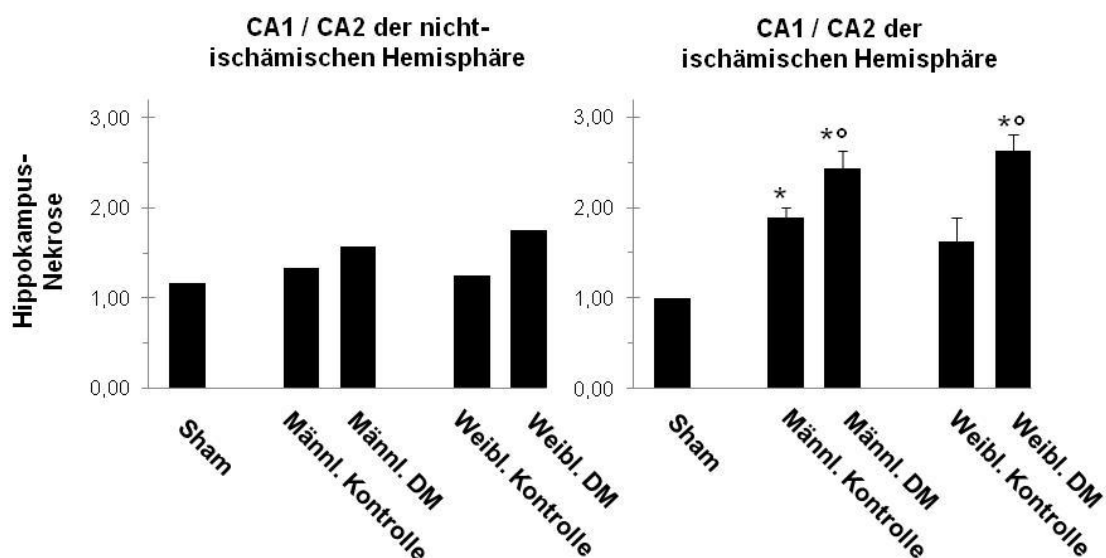


Abb. 34: MAP2-Verlust in der CA1- und CA2-Region der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% MAP2-Verlust. Beachte den vermehrten MAP2-Verlust sowohl der männlichen Kontrolltiere als auch der männlichen und weiblichen DM-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren innerhalb der ischämischen Hemisphäre. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM- zu den Kontroll-Tieren, MW \pm SEM)

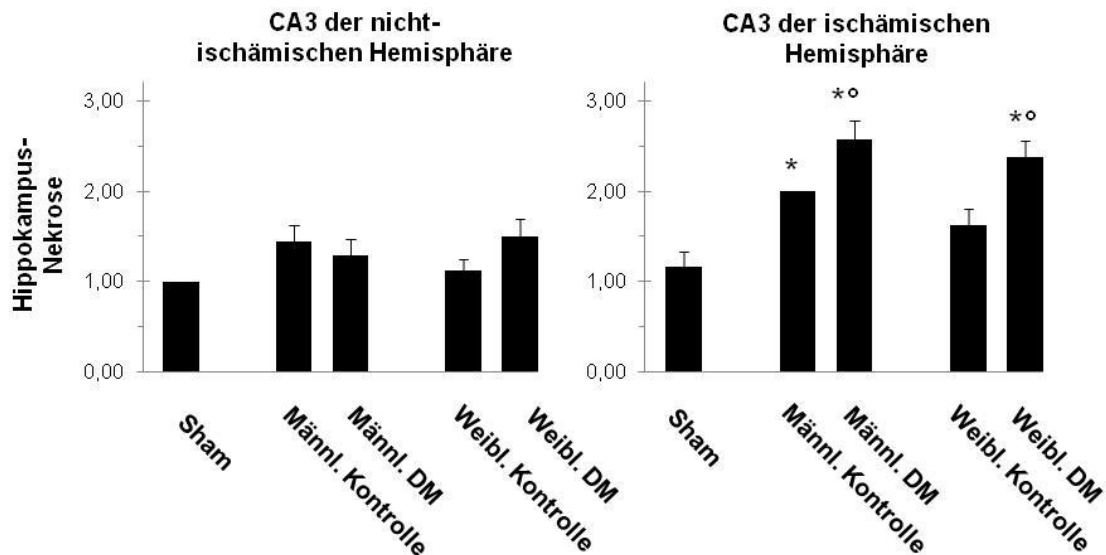


Abb. 35: MAP2-Verlust in der CA3-Region der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% MAP2-Verlust. Beachte den signifikant erhöhten MAP2-Verlust sowohl der männlichen Kontrolltiere als auch der männlichen und weiblichen DM-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren innerhalb der ischämischen Hemisphäre. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM- zu den Kontroll-Tieren, $MW \pm SEM$)

In Hinblick auf die CA4-Region sowie das innere und äußere Blatt des Gyrus dentatus wurde jeweils eine signifikant verringerte MAP2-IR bei den weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren deutlich ($p \leq 0,05$, Abb. 36, 37 und 38). Darüber hinaus waren keine Gruppenunterschiede zu ermitteln (Abb. 36, 37 und 38).

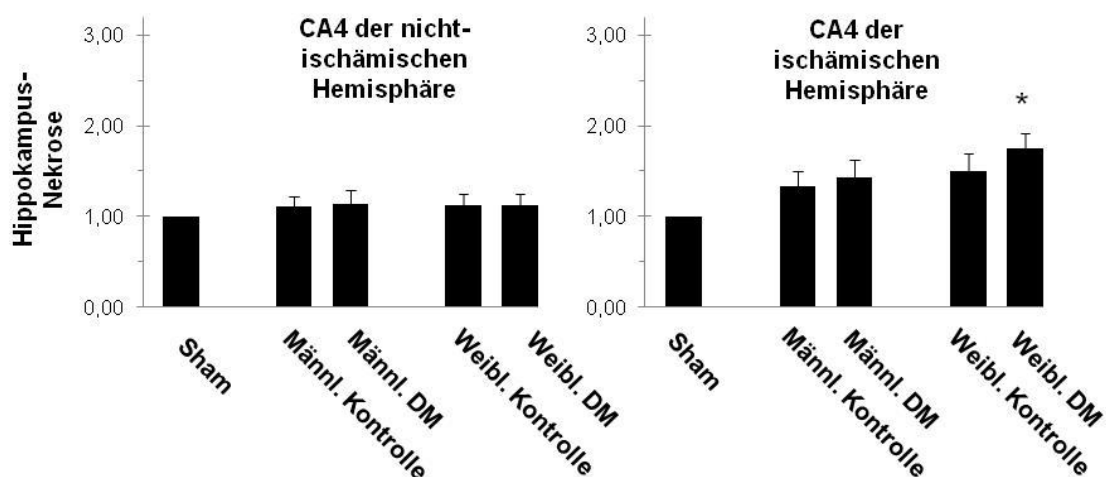


Abb. 36: MAP2-Verlust in der CA4-Region der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% MAP2-Verlust. Beachte die signifikant erhöhte Nekrose der weiblichen DM-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren innerhalb der ischämischen Hemisphäre. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, $MW \pm SEM$)

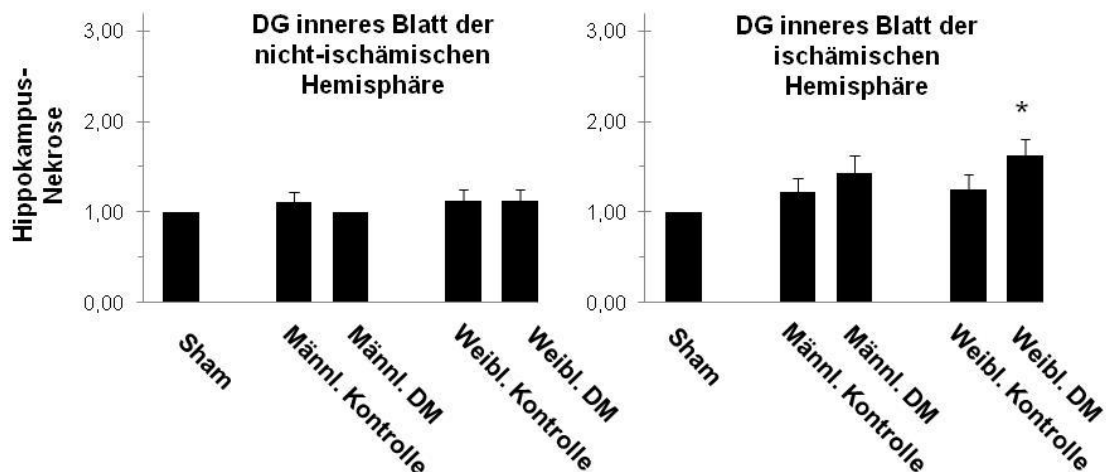


Abb. 37: MAP2-Verlust im inneren Blatt des Gyrus dentatus (DG) der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% MAP2-Verlust. Beachte den signifikant vermehrten MAP2-Verlust der weiblichen mit DM-vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren. (* $p \leq 0,05$, MW±SEM)

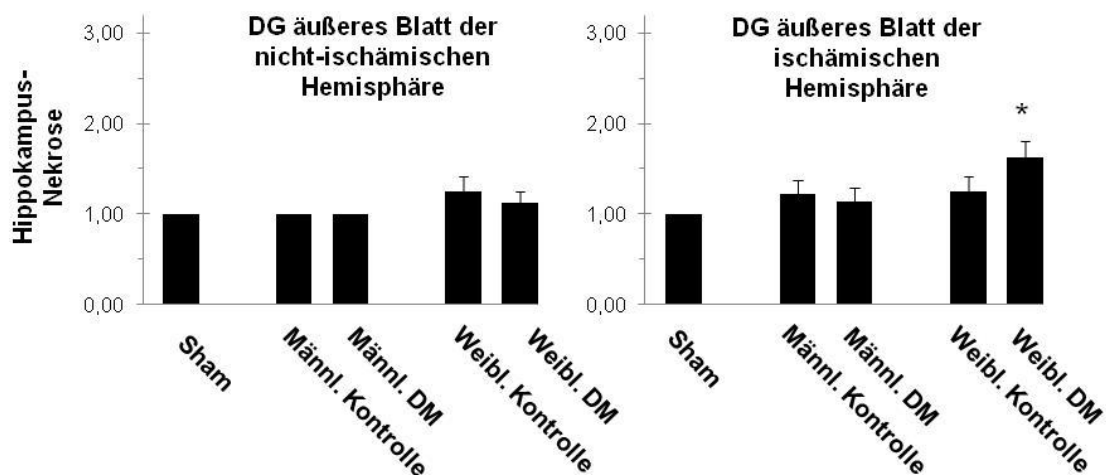


Abb. 38: MAP2-Verlust im äußeren Blatt des Gyrus dentatus (DG) der nicht-ischämischen und ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% MAP2-Verlust. Beachte den signifikant vermehrten MAP2-Verlust der weiblichen mit DM-vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren. (* $p \leq 0,05$, MW±SEM)

5.5.3 Hippokampale Schädigung im Vergleich von CV- und MAP2-Färbung

Beim Vergleich zwischen den nekrotischen Zelluntergängen in der CV-Färbung und dem Verlust der MAP2-IR zeigte sich in der CA1- und CA2-Region sowie in der CA3- und CA4-Region kein Unterschied innerhalb der Färbungen (Abb. 39, 40 und 41).

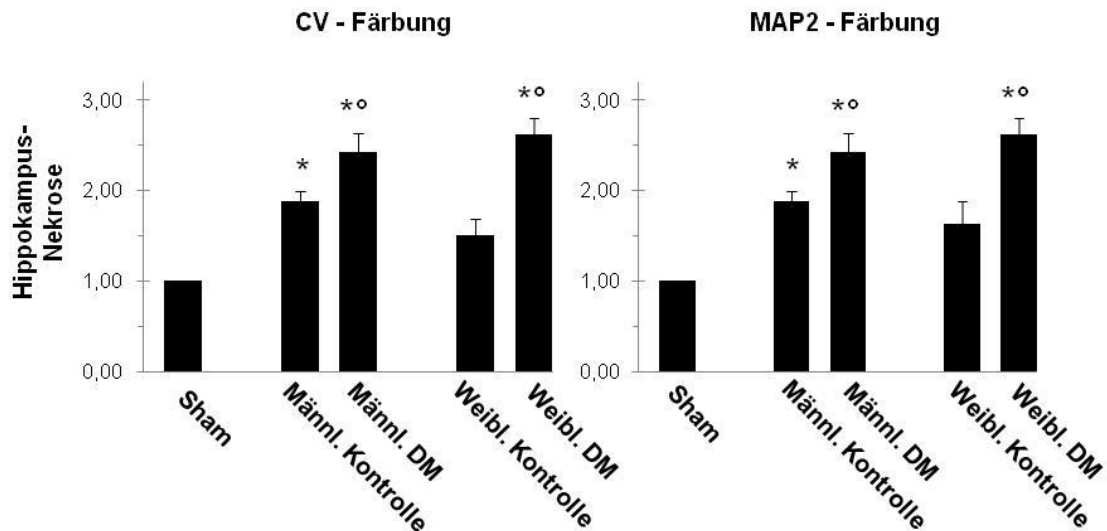


Abb. 39: Nekrotische Zelluntergänge und MAP2-Verlust in der CA1- und CA2-Region der ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% Nekrose/MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% Nekrose/MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% Nekrose/MAP2-Verlust. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Färbungen. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM- zu den Kontroll-Tieren, MW \pm SEM)

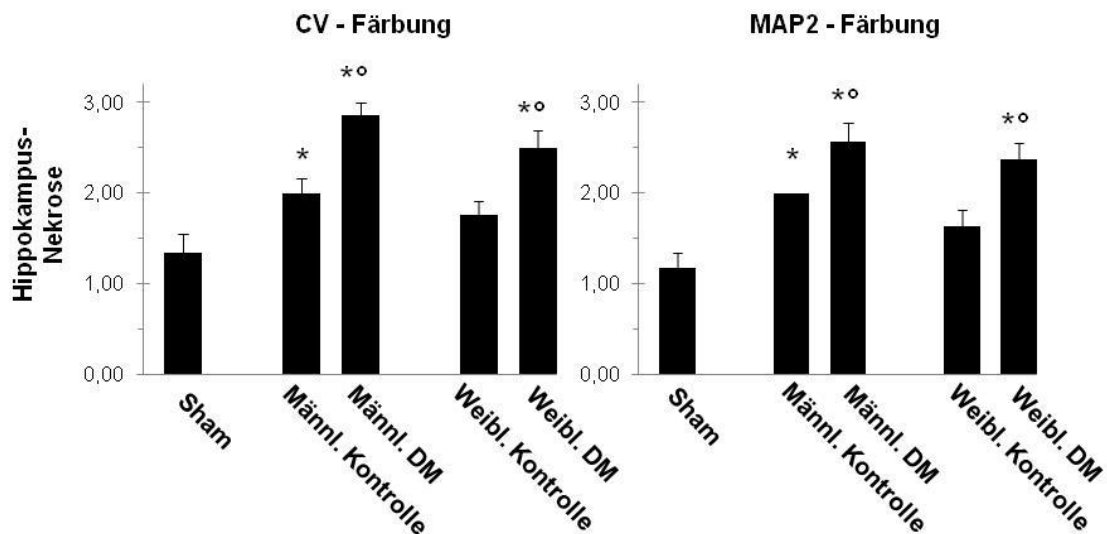


Abb. 40: Nekrotische Zelluntergänge und MAP2-Verlust in der CA3-Region der ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% Nekrose/MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% Nekrose/MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% Nekrose/MAP2-Verlust. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Färbungen. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM- zu den Kontroll-Tieren, MW \pm SEM)

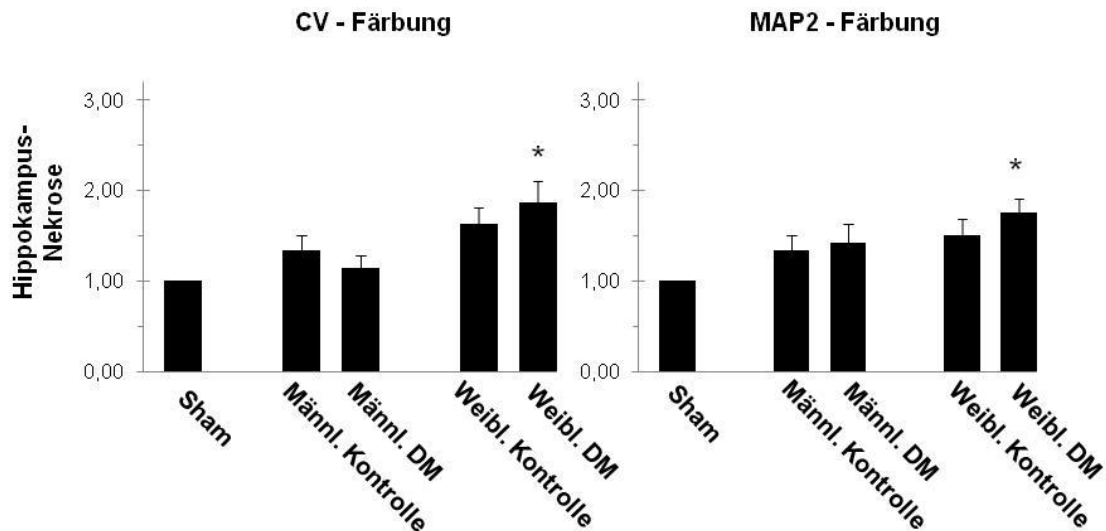


Abb. 41: Nekrotische Zelluntergänge und MAP2-Verlust in der CA4-Region der ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% Nekrose/MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% Nekrose/MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% Nekrose/MAP2-Verlust. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Färbungen. (* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu den Sham-Tieren, ° $p \leq 0,05$ im Vergleich von den DM- zu den Kontroll-Tieren, MW \pm SEM)

Dahingegen konnte im inneren und äußeren Blatt des Gyrus dentatus ein deutlich größerer MAP2-Verlust bei den weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren verzeichnet werden ($p \leq 0,05$, Abb. 42 und 43), während sich demgegenüber die nekrotischen Zelluntergänge in der CV-Färbung zwischen den Gruppen nicht unterschieden (Abb. 42 und 43).

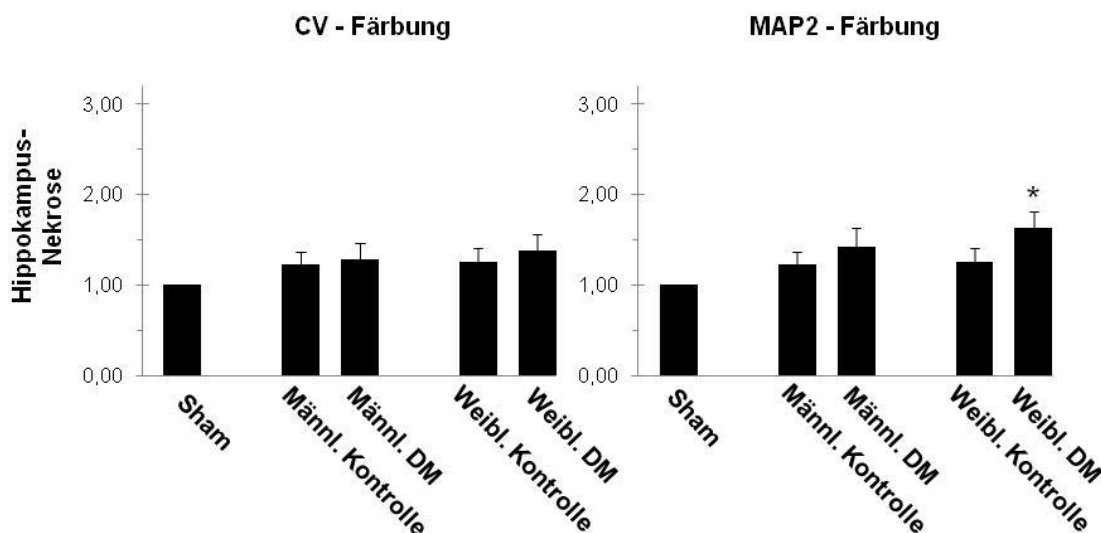


Abb. 42: Nekrotische Zelluntergänge und MAP2-Verlust im inneren Blatt des Gyrus dentatus der ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% Nekrose/MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% Nekrose/MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% Nekrose/MAP2-Verlust. Beachte den signifikant vermehrten MAP2-Verlust der weiblichen mit DM-vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren, während in der CV-Färbung keine Unterschiede erkennbar waren. (* $p \leq 0,05$, MW \pm SEM)

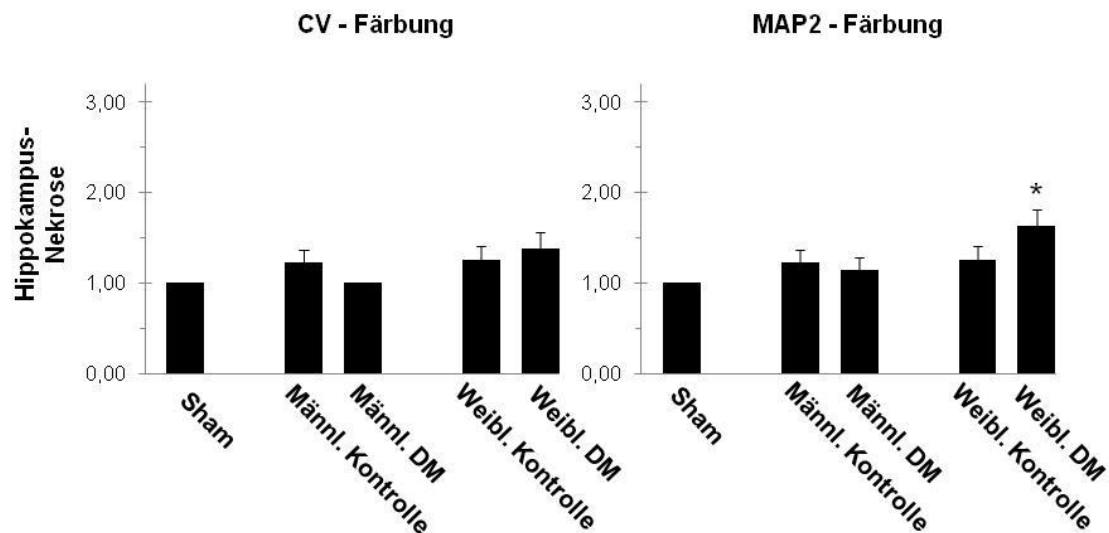


Abb. 43: Nekrotische Zelluntergänge und MAP2-Verlust im äußeren Blatt des Gyrus dentatus der ischämischen Hemisphäre. 1,00: 0-10% Nekrose/MAP2-Verlust, 2,00: 10-50% Nekrose/MAP2-Verlust, 3,00: >50-90% Nekrose/MAP2-Verlust. Beachte den signifikant vermehrten MAP2-Verlust der weiblichen mit DM-vorbehandelten Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren, während in der CV-Färbung keine Unterschiede erkennbar waren. (* $p \leq 0,05$, MW \pm SEM)

6 DISKUSSION

6.1 Methodendiskussion

6.1.1 Die Laborratte als Versuchstier

Die Entwicklung eines reproduzierbaren und zuverlässigen Tiermodells der zerebralen Ischämie erlaubt eine wissenschaftliche Untersuchung der Pathophysiologie von infarktbedingten Läsionen sowie die der Effizienz verschiedener therapeutischer Behandlungsmethoden (Bederson et al. 1986). Unter idealen Bedingungen wird die experimentelle Gefäßokklusion mit oder ohne anschließender Reperfusion von vorhersagbaren Veränderungen begleitet, wie die der Hirndurchblutung oder des Infarktgrades, der wiederum zu Läsionen vorabsehbarer Lokalisation und Größe führt (Garcia 1984). Zur Sicherstellung der Zuverlässigkeit der neurologisch-experimentellen Methoden sollten die hinzugezogenen Versuchstiere eine ausreichende neurologische Ähnlichkeit zum Menschen besitzen, vor allem in Bezug auf gewisse Verhaltenszüge, sensor-motorische Integration sowie den relativen Umfang des Neokortex. Für all diese Anforderungen ist die Laborratte als ein gut untersuchtes, relativ preiswertes und leicht verfügbares Lebewesen einwandfrei geeignet und wird daher allgemein für Studien zu Metabolismus, Neurochemie und Neurophysiologie genutzt (Klatzo 1967, Bederson et al. 1986). Darüber hinaus existiert eine große Anzahl verschiedenartiger zerebraler Ischämie-Modelle der Ratte, wozu u.a. die bilaterale Okklusion der Carotiden (Eklof und Siesjo 1972), die intrakranielle Kompression (Ljunggren et al. 1974), die arterielle Mikroembolisation (Salford et al. 1973) usw. zählen. Während all diese Methoden zur Untersuchung unterschiedlicher Aspekte der globalen zerebralen Ischämie gebraucht werden, nutzen sie allerdings nur wenig als zuverlässiges Modell fokaler zerebraler Ischämie, wie sie beim Schlaganfall auftritt. Ein Beispiel für diese lokal beschränkte Ischämiesetzung ist die u.a. auch in dieser wissenschaftlichen Arbeit durchgeführte Okklusion der MCA, kurz MCAO (Bederson et al. 1986).

6.1.2 Die MCAO als fokales Ischämie-Modell

Die Okklusion der MCA wurde erstmals im Jahr 1975 (Robinson et al. 1975) beschrieben und mündet in einem ischämischen Schaden, der hauptsächlich den

fronto-parietalen Kortex und die anterolateralen Anteile des Caudoputamen (Striatum) betrifft (Anwar et al. 1993, Coert et al. 1999). Das besagte Modell gilt als eines der besten für die Untersuchung embolischer Hirninfarkte und liefert übereinstimmende Ergebnisse in Bezug auf die Änderung der Hirndurchblutung und die neuropathologischen Veränderungen im Vergleich zum Media-Infarkt beim Menschen (Shigeno et al. 1985).

Transtemporaler Zugangsweg

Zunächst existiert die Methode des transtemporalen Zugangs mit nachfolgender permanenter Koagulation der MCA, die aber als Folge der notwendigen Kraniotomie viele Nachteile in sich birgt (Tamura et al. 1981, Coyle 1982). Hierunter fallen mögliche Veränderungen des intrakraniellen Druckes, die Gefahr einer bakteriellen Invasion und eine damit verbundene pathologische Auswertung des Gewebes (Coyle 1982). Darüber hinaus wird hier die MCA dauerhaft verödet, so dass keine Reperfusion möglich ist. Überdies kann beim transtemporalen Zugangsweg keine 100%ige Inzidenz von Infarktauslösungen erreicht werden (Bederson et al. 1986). Es erfolgt eine Verödung der MCA entweder an ihrem Ursprung, an der Kreuzungsstelle mit dem Tractus olfactorius oder mit der Vena cerebri inferior (in einer Länge von 1 bis 2 mm). Diese Verödungen führen lediglich bei 13%, 67% bzw. 0% der Versuchstiere zu einer infarktbedingten Läsion (Bederson et al. 1986). Im Gegensatz dazu erreicht man mit einer ausgedehnteren Okklusion (in einer Länge von 3 bis 6 mm) der MCA, beginnend weiter proximal der Kreuzungsstelle mit dem Tractus olfactorius, einheitliche Infarkte gleicher Größe, Lokalisation und neurologische Defizite in 100% der Fälle. Die neurologischen Ausfälle entsprechen bei reproduzierbarer Lokalisation der Größe des infarzierten Areals (Bederson et al. 1986).

Fadenmodell

Seit der erstmaligen Beschreibung vor 22 Jahren (Koizumi et al. 1986) hat sich das intraluminale Fadenmodell (fortan immer als MCAO bezeichnet) zu einem bedeutenden Werkzeug für Studien an der Pathophysiologie und Behandlung von Schlaganfällen etabliert. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Techniken des Modells entwickelt, wobei jede einzelne Methode das Einführen eines Fadens in den arteriellen Circulus Willis zur Blockade des Ursprungs der MCA beinhaltet

(Nagasawa und Kogure 1989, Zea Longa et al. 1989). Diese Technik zeichnet sich durch einen wesentlich leichteren und weniger traumatischen Zugangsweg in die A. carotis communis über das Verschieben des Okklusionsfadens vor dem Abgang der MCA in die A. carotis interna aus (Zea Longa et al. 1989) im Vergleich zur Methode des transtemporalen Zugangswegs (Tamura et al. 1981). Darüber hinaus ermöglicht das Fadenmodell die Durchführung einer Reperfusion verbunden mit dem typischen Reperfusionsschaden, in Anlehnung an die klinischen Bedingungen. Aufgrund der überwiegenden Vorteile dieser zuletzt genannten Methode mit der Möglichkeit der Reperfusion sowie ihrer klinischen Relevanz wurde sich in der vorliegenden Arbeit auf die Umsetzung dieser eher atraumatischen Variante geeinigt (Koizumi et al. 1986, Zea Longa et al. 1989).

6.1.3 Hirninfarktlokalisationen nach MCAO

Im Zusammenhang mit einer zerebralen Ischämie besteht eine unterschiedliche Ischämieempfindlichkeit, weshalb einige Hirnregionen stärker von einer ischämischen Hirnschädigung betroffen sind als andere. Diese Vulnerabilitätsunterschiede bestehen auch im Versorgungsgebiet der MCA (Abb. 44, nach Nagasawa und Kogure 1989) und sind zum einen von der unterschiedlichen Ischämie-Empfindlichkeit des Gewebes (Garcia et al. 1995) und zum anderen von der Kollateralversorgung (siehe 6.1.4.1) abhängig. Prinzipiell resultiert die MCAO in einem subkortikalen und kortikalen Infarkt und einer hippokampalen Schädigung (Butler et al. 2002). Die in der vorliegenden Arbeit nach der MCAO zu erkennende zerebrale Schädigung findet sich in Regionen des lateralen Caudoputamen sowie des frontoparietalen Kortex (insbesondere der frontoparietale somatosensorische Kortex CX-2 und CX-3), der Capsula externa, des Corpus callosum und des Hippokampus (Abb. 45, siehe 6.2.1).

Aufgrund des verzögerten Einsetzens des Zelltodes im Laufe der Zeit besteht die Möglichkeit, die betroffenen Neurone mit Hilfe therapeutischer Intervention vor dem Zelltod zu bewahren. Innerhalb der einzelnen Regionen des Hippokampus zeigen sich hierbei jedoch deutliche Unterschiede bezüglich der Vulnerabilität gegenüber einer Ischämie, wobei die Empfindlichkeit von der CA1- und CA2- über die CA3-Region bis hin zum Gyrus dentatus abnimmt (Schmidt-Kastner und Freund 1991). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine ischämische Hirnschädigung bei dem gegenüber einer zerebralen Ischämie besonders vulnerablen Hippokampus

vorrangig im Bereich der CA1- und CA2- sowie in der CA3-Region der ischämischen Hemisphäre (siehe 6.2.1). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, wobei die CA1-Region des Hippokampus vorrangig und am schwersten von einer Ischämie betroffen ist (Butler et al. 2002). Demgegenüber ist der Gyrus dentatus vermutlich die resistanteste hippokampale Region gegenüber einer Ischämie. Demnach mündet eine milde Schädigung (oder kurze Okklusionszeiten) in den Zelltod einiger der empfindlichsten Regionen, während ein schwerer Schaden alle Regionen betrifft (Schmidt-Kastner und Freund 1991, Butler et al. 2002).

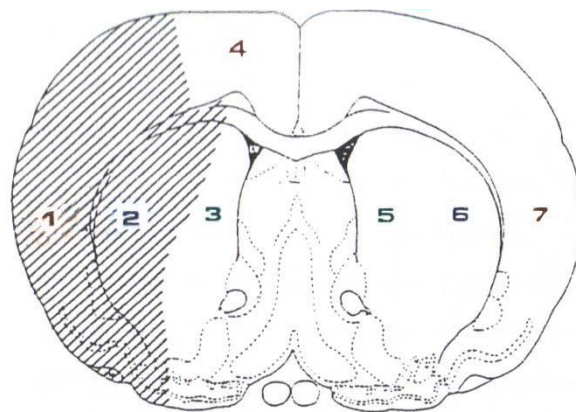


Abb. 44: Typische ischämische Areale bei einer MCAO mit dem Fadenmodell, 1 und 7: frontoparietaler somatosensorischer Kortex (versorgt durch die MCA); 2 und 6: laterale Segmente des Caudoputamen (versorgt durch die MCA); 3 und 5: mediale Segmente des Caudoputamen (versorgt durch die MCA) und Teile des Pallidum (versorgt durch die A. carotis interna über die A. chorioidea anterior); 4: frontoparietaler motorischer Kortex (versorgt durch die A. cerebri anterior). Das gestrichelte Areal repräsentiert das Gewebe, welches in Folge einer MCAO vorrangig betroffen ist. (nach Nagasawa und Kogure 1989)

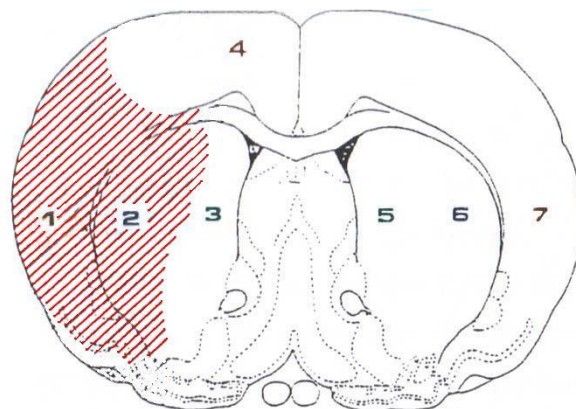


Abb. 45: Typische ischämische Areale bei der MCAO in der vorliegenden Arbeit. 1 und 7: frontoparietaler somatosensorischer Kortex (versorgt durch die MCA); 2 und 6: laterale Segmente des Caudoputamen (versorgt durch die MCA); 3 und 5: mediale Segmente des Caudoputamen (versorgt durch die MCA) und Teile des Pallidum (versorgt durch die A. carotis interna über die A. chorioidea anterior); 4: frontoparietaler motorischer Kortex (versorgt durch die A. cerebri anterior). Das gestrichelte Areal repräsentiert das Gewebe, welches in Folge einer MCAO vorrangig betroffen ist.

Schlaganfall-Läsionen, welche u.a. durch die MCAO-Methode experimentell initiiert werden, bestehen aus dem Infarktkern und der Penumbra (Astrup et al. 1981, Memezawa et al. 1992). Der Infarktkern ist vollständig ischämisch und kann trotz prompter Rezirkulation nicht gerettet werden. Das Gewebe der Penumbra hat hingegen eine höhere Durchblutung und somit dank Reperfusion oder dem Einsatz von Substanzen eine wesentlich bessere Überlebensrate (Memezawa et al. 1992). Die Penumbra ist somit eine Region mit minimalen Flussraten, welche jedoch über einer gewissen Schwelle liegen, sodass ein Verlust der Energieversorgung, eine Unterdrückung von Membranpotentialen und die damit verbundene Hemmung neuronaler Signalübertragung gerade noch verhindert wird (Astrup et al. 1981). Das an den Infarktkern angrenzende Gewebe der Penumbra ist demnach gerade ausreichend durchblutet, um die Funktion der Plasmamembran und die Kontrolle des Ionengradienten aufrecht zu erhalten, demgegenüber aber gerade ausreichend ischämisch, um die Fähigkeit zum Auslösen spontaner oder provozierter Aktionspotentiale zu verlieren. Somit besteht das Gewebe der Penumbra aus Neuronen, die zwar funktionslos, aber noch nicht abgestorben sind (Garcia et al. 1995). In der Ratte enthält der Infarktkern für gewöhnlich den lateralen Anteil des Caudoputamens und wenige Schichten des Neokortex, während die Penumbra aus großen Teilen des Neokortex besteht, welche nicht ausreichend mit Kollateralen der A. cerebri anterior und posterior versorgt werden (Abb. 46, Memezawa et al. 1992).

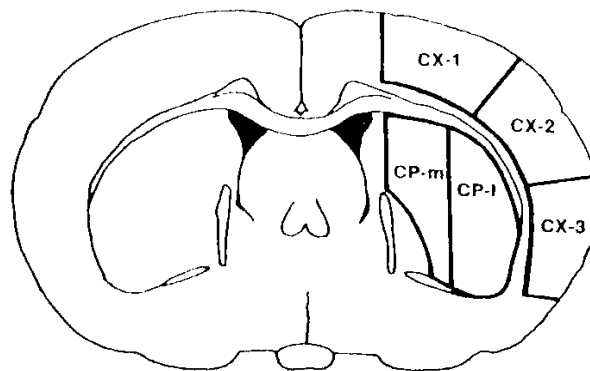


Abb. 46: Anatomische Regionen des Neokortex und Caudoputamens. CX-1: frontoparietaler motorischer Kortex, CX-2: oberer Teil des frontoparietalen somatosensorischen Kortex, CX-3: unterer Teil des frontoparietalen somatosensorischen Kortex, CP-m: mediales Caudoputamen, CP-l: laterales Caudoputamen. (nach Memezawa et al. 1992)

Folglich ist im Anschluss an eine MCAO der Infarktkern (das laterale Caudoputamen; CP-l, und der frontoparietale somatosensorische Kortex; CX-3) häufiger von einem Infarkt betroffen, während die besser durchblutete Penumbra (Teile des medialen

Caudoputamen; CP-m, und der obere frontoparietale Kortex; CX-1 und 2) im Allgemeinen die Dauer der Ischämie überlebt (Abb. 46, Memezawa et al. 1992). In Regionen des Infarktkerns (das laterale Caudoputamen und der angrenzende Neokortex) sinkt die Hirndurchblutung auf 15% des Normalwertes für diese Region (Bolander et al. 1989), während innerhalb der Penumbra (z.B. im medialen Caudoputamen und dem Globus pallidus) die Hirndurchblutung lediglich auf Werte über 20% vom Ausgangswert reduziert ist. Zudem kann es in weiter entfernt gelegenen Teilen der Läsion zwar zur marginalen Hypoperfusion kommen, diese muss aber nicht immer mit einem nachweisbaren strukturellen Schaden assoziiert sein (Bolander et al. 1989). Die Hirndurchblutungssenkung kann mit einer Steigerung des zerebrovaskulären Gefäßwiderstandes assoziiert sein und zu einer signifikanten Senkung des O₂-Angebotes in den subkortikalen und Hirnstammstrukturen führen (Schwab 2002). Darüber hinaus befinden sich auch innerhalb der kontralateralen Hemisphäre Gebiete der Hypoperfusion, welche wahrscheinlich auf das bekannte Phänomen der Diaschisis während ausgedehnter Ischämie zurückzuführen sind (Nagasawa und Kogure 1989). In der vorliegenden Arbeit ist ein Vorkommen der Diaschisis nicht erkennbar, da vermutlich die entstehenden Infarkte in Folge der 30-minütigen Okklusionszeiten in ihrer Größe nicht ausgedehnt genug sind. Jedoch kommt es im Zusammenhang mit einer zerebralen Ischämie nicht nur zu Hypoperfusions-Erscheinungen, sondern gleichfalls zu Ereignissen der Hyperperfusion unmittelbar im Anschluss an eine Ischämie (Bolander et al. 1989). Die postischämische Hyperperfusion unterschiedlichen Ausmaßes ist als ein Zeichen adäquater Reperfusion oder gestörter Autoregulation zu verstehen (Weber et al. 2004). Demgegenüber steht die späte, sekundäre Hyperperfusion (Bolander et al. 1989) als ein Mechanismus reaktiver Hyperämie oder Neovaskularisation, beginnend bei 18 Stunden bis hin zu 7 Tage nach MCAO (Hakim et al. 1992). Früher wurde vermutet, dass sich das Phänomen der sekundären Hyperperfusion auf einer Gewebe-Azidose oder „Luxus-Perfusion“ aufbaut. Mittlerweile wird allerdings angenommen, dass Hyperperfusionerscheinungen im Zusammenhang mit neuronaler und metabolischer Hyperaktivität sowie einem erhöhten Glucose-Umsatz stehen (Hakim et al. 1992). Unabhängig von deren ursächlichen Entstehungsmechanismen scheinen diese sekundären Hyperperfusionerscheinungen eine sekundäre Entzündungsreaktion anzutreiben. Demnach wird die in Folge einer zerebralen Ischämie ablaufende Akkumulation der

neutrophilen Granulozyten, die wiederum im Zusammenhang mit einem sekundären neuronalen Schaden steht, durch die sekundären Hyperperfusionserscheinungen beschleunigt (Yi et al. 2007).

6.1.4 Variabilität der MCAO

Ein eher unvorteilhaftes Charakteristikum des MCAO-Modells ist die ausgeprägte Variabilität der Ischämie und damit verbunden die relativ schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, u.a. aufgrund der Variabilität der durch die MCA versorgten Hirngebiete bei der Ratte (Coert et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit führt die MCAO regelhaft zu einer zerebralen Schädigung im Bereich des lateralen Caudoputamen und des frontoparietalen Kortex (insbesondere der frontoparietale somatosensorische Kortex CX-2 und CX-3). Es zeichnet sich jedoch eine gewisse Varianz hinsichtlich des Volumens der Infarkte ab. So lässt sich bei insgesamt 7 der 32 Versuchstiere (eine weibliche mit DM-vorbehandelte Ratte und jeweils 3 männliche und weibliche Kontrolltiere) kein deutlicher Infarktbereich zu erkennen, währenddessen die übrigen Ratten in der Größe und Lokalisation relativ gleichmäßige Infarkte zeigen, die neben dem lateralen Caudoputamen und dem frontoparietalen Kortex auch den Hippokampus, die Capsula externa und das Corpus callosum betreffen. Der variable Bereich war nichtsdestotrotz wesentlich kleiner als die reproduzierbaren Areale, so dass eine zuverlässige Auswertung möglich war. Mit dem Ziel der Verminderung der Variabilität wurden vor allem in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Varianten des Modells der Verödung oder Okklusion der MCA vorgeschlagen (Robinson 1979, Tamura et al. 1981, Bederson et al. 1986, Ginsberg und Busto 1989, Nagasawa und Kogure 1989, Zea Longa et al. 1989, Belayev et al. 1996, Garcia et al. 1997, Aspey et al. 1998, Coert et al. 1999, Aspey et al. 2000). Die Variabilität der MCAO ist neben der Vaskularisierung auf eine Vielzahl von Faktoren zurückzuführen, wie z.B. das Alter der Versuchstiere, Einflüsse des Modells selbst (Okklusionsmaterialien, Dauer der Okklusion, durchgeführte Reperfusion, usw.) und Einflüsse physiologischer Parameter, auf die alle im weiteren Verlauf eingegangen wird (Coert et al. 1999).

6.1.4.1 Zerebrale Gefäßversorgung bei der Ratte

Die Ursachen für die offensichtlichen interindividuellen Unterschiede bezüglich der Infarktausdehnung bei dem verwendeten MCAO-Modell liegen u.a. in der Anatomie

der Gefäßversorgung des Rattengehirns begründet (Bederson et al. 1986). Im Allgemeinen sind die Versorgungsgebiete und die Anatomie der A. cerebri anterior, media und posterior in Ratten analog zu der beim Menschen (Coyle 1975, Yamori et al. 1976). Obwohl in Ratten die A. cerebri posterior direkt aus dem proximalen intrakraniellen Anteil der A. carotis interna entspringt, verbindet die A. communicans posterior die terminalen Äste der A. basilaris mit der A. cerebri posterior (Zea Longa et al. 1989). Des Weiteren ist die Blutversorgung des Thalamus und der Basalganglien in der Ratte ebenso ähnlich wie beim Menschen (Rieke et al. 1981).

Der im Zusammenhang mit dem MCAO-Modell intraluminal gelegene Faden führt zu einer Einschränkung der Hirndurchblutung u.a. zu den Basalganglien, bedingt durch den Verschluss aller rückläufigen Äste der MCA, mit Ausnahme von Abzweigungen der A. cerebri anterior. Im Gegensatz zu den Ästen der MCA bleiben diese Äste weiterhin geöffnet für die Kollateraldurchblutung aus der kontralateralen A. cerebri anterior sowie kontralateralen extrakraniellen Ästen der A. pterygopalatina. Folglich sind vorrangig die mittleren und hinteren Anteile des Caudoputamen, welche die Capsula interna und den vorderen Thalamus umfassen von der Ischämie betroffen (Zea Longa et al. 1989). Der laterale Anteil der anterioren Basalganglien wird über lenticulostriatale Äste der MCA versorgt, die proximal der Kreuzungsstelle mit dem Tractus olfactorius entspringen. Dem gegenüber versorgt die A. cerebri anterior über die Heubnersche Arterie den medialen Anteil der Basalganglien, während der posteriore Teil der Basalganglien seinen Zufluss von medialen lenticulostriatalen Ästen ebenfalls aus der MCA erhält (Coyle 1975). Die Persistenz der reichlich vorhandenen kollateralen Zirkulation resultiert wahrscheinlich in der geringen Infarkt-Inzidenz von nur 13% innerhalb der Basalganglien bei der Methode des MCAO-Fadenmodells (Bederson et al. 1986). Demzufolge ist die Isolation der lenticulostriatalen und kleinen kortikalen Arterien von der proximalen und distalen Kollateralversorgung eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung eines Infarkts in 100% der Ratten. Ohne eine derartige Isolation ist in der vorliegenden Arbeit eine Infarktinzidenz von 78,1% der untersuchten Ratten erreicht worden, wobei sich diese Angabe vorrangig auf subkortikale, kortikale und hippokampale Regionen bezieht. In Bezug darauf ist insbesondere das Caudoputamen von der ischämischen Hirnschädigung betroffen, währenddessen in den übrigen Basalganglien, wie beispielsweise dem Globus pallidus und Nucleus medialis thalami, keine Infarktareale nachweisbar sind (siehe 6.2.1).

Ein temporärer Verschluss der A. carotis interna (ähnlich der hier durchgeführten Arbeit) reduziert den Kollateralfloss zu der MCA, indem die proximale Versorgung zur A. cerebri anterior und posterior limitiert wird (Bederson et al. 1986). Somit ist wahrscheinlich aufgrund der relativ schlechten kollateralen Gefäßanbindung das Gewebe des Caudoputamen nach einer MCAO wesentlich stärker von der Ischämie betroffen, als das kortikale Gewebe (Garcia et al. 1995). Ebenso ist die Hirndurchblutung im Caudoputamen bedeutend niedriger als im frontoparietalen Kortex (Garcia et al. 1995).

Im MCAO-Modell kann das ischämische Areal durch den zerebralen arteriellen Circulus Willis über die kontralaterale A. carotis interna, die A. basilaris und die Kollateralzirkulation kortikaler Äste der Zerebralarterien reperfundiert werden (Nagasawa und Kogure 1989). Jedoch finden sich innerhalb dieses Gefäßnetzes häufig anatomische Varianten und Anomalitäten, weshalb eine reproduzierbare Auslösung der Ischämie in diesem Modell nicht immer gewährleistet ist. Unterschiede im motorischen neurologischen Outcome hängen insbesondere von der Kollateralisierung der proximalen Seitenäste der MCA ab (Coert et al. 1999).

6.1.4.2 Einfluss des Alters

Von Nachteil für die Übertragung der beim MCAO-Modell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen ist die bessere kollaterale Versorgung bei Ratten. Während die vaskuläre Anatomie von Nagetieren und Primaten während der Fetalentwicklung einander ähnlich ist (Coyle 1975, Yamori et al. 1976), unterlaufen während der neonatalen Entwicklung der Nagetiere die reichlich vorhandenen Kollateralen zwischen den distalen Ästen der A. cerebri anterior, media und posterior keiner beträchtlichen Abnahme (Coyle und Jokelainen 1982). Anders beim Menschen und weiteren Primaten, wo sich diese Kollateralen während der Neonatalperiode zurückbilden. Folglich gipfelt eine Okklusion am Ursprung der MCA beim Primaten in eine schwerere Reduktion der Hirndurchblutung zu den Basalganglien und zum Kortex (Symon et al. 1975, Bederson et al. 1986).

Da das Gehirn im Senium eine geringere Plastizität hat, werden zerebrale Infarkte im Alter wesentlich schlechter toleriert. Demnach ist bei Ratten in zunehmendem Alter das Mortalitätsrisiko und das Risiko größerer Infarkte mit bleibenden Defiziten infolge eines ischämischen Schadens erhöht (Wang et al. 2003). In Übereinstimmung damit tolerierten unsere Ratten die bei jüngeren Tieren übliche 1 bis 2 stündige Ischämie in

Vorversuchen nicht, sodass die Ratten im Senium in der vorliegenden Arbeit lediglich einer 30-minütigen Ischämie ausgesetzt wurden. Die verminderte Plastizität im Senium liegt vermutlich nur an vaskulären Veränderungen (z.B. Arteriosklerose), da eine Studie gezeigt hat, dass -eine gleiche Infarktgröße vorausgesetzt- sich alte Ratten (wie z.B. die 2 jährigen Versuchstiere in dieser Arbeit) von einer überlebten MCAO-Prozedur ebenso gut erholen, wie es auch jungen Ratten (z.B. in einem Alter von 3 - 4 Monaten) möglich ist (Wang et al. 2003).

Die Diskrepanzen zwischen dem Alter der Versuchstiere im Vergleich zu denen der Risikopatienten für einen Schlaganfall stellen eine Ursache für die häufig geringe Korrelation zwischen Tier- und klinischen Schlaganfall-Versuchen dar (Li et al. 1996). Im Gegensatz zu den meisten Studien, die an jungen Ratten durchgeführt werden, wurde sich mit Berücksichtigung der klinischen Relevanz -die meisten Schlaganfälle betreffen ältere Menschen (Malmgren et al. 1987)- in der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung 2 jähriger und somit älterer Versuchstiere beschränkt.

6.1.4.3 Einfluss unterschiedlicher Okklusionsmaterialien

Der zur MCAO verwendete Faden hat wahrscheinlich auch einen Effekt auf den Grad der Ischämie und das Infarktvolumen (Aspey et al. 1998). In der hier vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Verwendung eines mit Silikon-beschichtetem Polyamid-Fadens festgelegt. Im Gegensatz zu diesem führt der unbehandelte, nicht mit Silikon-beschichtete Faden oftmals lediglich zu einer inadäquaten Okklusion des Gefäßes, wodurch er einen Infarkt von geringerem Volumen, jedoch größerer Varianz verursacht. Währenddessen hat der Silikon-beschichtete Faden wesentlich gravierendere Auswirkungen auf die Mortalitätsrate, das Infarktvolumen sowie das Ausmaß des Ödems, resultiert dafür aber in besser reproduzierbaren kortikalen und subkortikalen Infarkten (Aspey et al. 1998). Ursächlich für diese offensichtlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Okklusionsmaterialien sind vermutlich ihre unterschiedlichen Mechanismen der Hirnschädigung. So resultiert die MCAO mit einem unbehandelten, nicht mit Silikon-beschichtetem Faden in einer langsam fortschreitenden Progression der kortikalen Läsion, wodurch es zum verzögerten zerebralen Zelltod -möglicherweise zur Apoptose- vor allem in Regionen der Penumbra kommt (Garcia et al. 1993, Du et al. 1996). Demgegenüber läuft die MCAO mit einem Silikon-beschichteten Faden (der sich leichter vorschieben lässt)

unter schwereren ischämischen Bedingungen ab, aufgrund dessen zeitnah ein primär nekrotischer Prozess eingeleitet wird (Garcia et al. 1993).

In der vorliegenden Studie haben wir Silikon-beschichtete Fäden verwendet, um größere Infarkte zu erzielen, wobei die Möglichkeit einer höheren Mortalitätsrate dabei in Kauf genommen wurde.

6.1.4.4 Einfluss unterschiedlicher Okklusionszeiten und Reperfusion

Die Ausbildung eines Hirninfarktes hängt von der Dauer der Okklusion und der Durchführung einer Reperfusion ab. In der vorliegenden Arbeit wurde im Anschluss an eine 30-minütige Okklusionszeit eine 28 Tage andauernde Reperfusion zugelassen, um das funktionelle Schlaganfalloutcome untersuchen zu können. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind nicht Thema der vorliegenden Arbeit, werden aber im Kapitel 6.2.1 diskutiert.

Sowohl das neuronale Überleben als auch die funktionelle Wiederherstellung nach einer MCAO sind abhängig von der Okklusionszeit und damit der Dauer des ischämischen Ereignisses und von der Reperfusion (Garcia et al. 1995). Trotz einiger Variabilitäten konnten zahlreiche Studien aufzeigen, dass das Ausmaß des Gewebeschadens im Anschluss an die temporäre Okklusion der MCA mit der Zeit zunimmt und einen Maximalwert nach 4 Stunden erreicht (Aspey et al. 2000). Diese Schlussfolgerung kann jedoch nicht auf alle Hirnregionen gleichermaßen angewendet werden. Während das Gewebe des Caudoputamen auf eine längere Okklusionszeit wie angesprochen mit einem vermehrten neuronalen Schaden reagiert, gibt es im kortikalen Gewebe keinerlei derartige Veränderungen bei Ausdehnung der Verschlusszeiten (Garcia et al. 1997). In der hier vorliegenden Untersuchung wurde sich auf eine Okklusionszeit von 30 Minuten festgelegt, da die 2 Jahre alten Ratten in Voruntersuchungen längere Ischämie-Zeiten nicht überlebten (siehe 6.1.4.2).

In Hinblick auf den sogenannten „Reperfusions-Schaden“ wird vermutet, dass das Ausmaß des Gewebedefekts vermutlich während der Reperfusion weiter ansteigt und sich über die Tage entwickelt (Aspey et al. 2000). Dieser Reperfusions-Schaden wird durch das Ausbleiben der Verringerung neurologischer Defizite trotz erfolgter Reperfusion widerspiegelt, wodurch auf eine Verschlimmerung des irreversiblen ischämischen Schadens durch eben diese geschlossen werden kann (Zea Longa et al. 1989). Die Reperfusion im Anschluss an eine Ischämie besitzt demnach

vermutlich schädigende Effekte in Folge eines erhöhten oxidativen Stresses (Hallenbeck und Dutka 1990, Siesjo 1992).

Es finden sich weitere sekundäre, die Hirninfarktgröße beeinflussende Effekte. Beispielhaft genannt seien in diesem Zusammenhang exzitatorische Aminosäuren, um den Infarkt lokalisierte Depolarisationswellen und freie Radikale, die sich in der Penumbra bilden. Zusätzlich zu dem neuronalen Zelluntergang in Folge der zerebralen Ischämie kommt es zu einem sekundären inflammatorisch bedingten neuronalen Zelluntergang sowie zur Apoptose. Die Apoptose stellt einen programmierten Zelltod dar, der verzögert nach einer zerebralen Ischämie auftritt.

Der Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes während der Reperfusion hat auch nachteilige Wirkungen durch die Stimulation der Produktion freier Radikale. Die Bildung freier Radikale schädigt nicht nur die Neurone, sondern auch die Endothelzellen der Blutgefäße mit dem Ergebnis eines sich darauf aufbauenden vasogenen Ödems (Aspey et al. 2000). Während der Reperfusion kommt es außerdem zu einer zunehmenden Infiltration von Leukozyten, die für das Freiwerden von vasokonstriktiven Substanzen, zytotoxischen Enzymen und freien Radikalen verantwortlich sind und überdies eine Obstruktion der Mikrozirkulation bedingen können (Aspey et al. 2000). Dies führt zu einer Verstärkung des vasogenen Ödems (Coert et al. 1999). Es ist unklar, inwieweit die Reperfusionszeit einen Einfluss auf die Ausbildung eines vasogenen Ödems bei der Ratte nach einer MCAO hat (Slivka et al. 1995, Coert et al. 1999, Slivka und Murphy 2001). Insgesamt ist die Reperfusion nicht mit einer gesteigerten Infarktgröße assoziiert (Hallenbeck und Dutka 1990, Siesjo 1992). Das liegt möglicherweise daran, dass die Reperfusion auch einige protektive Effekte hat. Diese sind z.B. das Wiederherstellen des oxidativen Metabolismus sowie der Abtransport akkumulierter Abbauprodukte des anaeroben Stoffwechsels.

Bei langen Reperfusionszeiten kann sich der ischämische Hirnschaden allerdings in einigen Hirnregionen vergrößern. So findet sich zwischen den verschiedenen Hirnregionen eine starke Diskrepanz in Hinblick auf die Gewebeempfindlichkeit gegenüber einer Reperfusion. Während die Größe eines Hirninfarktes im Caudoputamen eher unabhängig von der Reperfusionszeit ist bzw. diese sogar einen protektiven Effekt hat, vergrößert sich der ischämische Zelluntergang im zerebralen Cortex mit zunehmender Reperfusionszeit (Garcia et al. 1997).

MCAO-Modelle mit Reperfusion resultieren in kleineren Infarkten im Vergleich zu den Modellen mit permanenter Okklusion, da bei den Reperfusionsmodellen die Okklusionszeiten geringer sind (Aspey et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass das infarzierte Areal im Anschluss an eine temporäre Okklusion der MCA um bis zu 15,7% kleiner ausgefallen ist als bei der Durchführung einer permanenten MCAO (Zea Longa et al. 1989). Das Muster kortikaler Pannekrose, welches nach einer permanenten Okklusion beobachtet werden kann, steht einem inkompletten ischämischen Schaden nach den meisten Fällen transienter Okklusion gegenüber (Garcia et al. 1995).

Zusammenfassend gehen längere Okklusionszeiten mit größeren Infarkten einher, wobei die Reperfusion abhängig vom Hirnareal zu einer Verkleinerung oder Vergrößerung des ischämischen Hirnschadens führt (Memezawa et al. 1992, Garcia et al. 1995).

6.1.4.5 Einfluss des Rattenstamms, systemischer Parameter und der Anästhesie

Neben den bereits angesprochenen Faktoren gibt es weitere Komponenten, die ebenfalls zu der ausgeprägten Variabilität der MCAO-Methode beitragen. In dieser Form wurde u.a. die Wirkung des Rattenstamms auf das Infarktvolumen und die Reproduzierbarkeit des MCAO-Modells identifiziert. Selbst der gleiche Rattenstamm von verschiedenen Züchtern entwickelt unterschiedliche Infarktvolumina (Oliff et al. 1995, Herz et al. 1996). Da wir die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ratten aus eigener Zucht verwendet haben, sind Variabilitätsunterschiede in Bezug darauf auszuschließen.

Die Infarktgröße hängt außerdem von der Körpertemperatur ab. Eine erhöhte Gehirntemperatur bedeutet einen gesteigerten Stoffwechsel und damit einen gesteigerten Energiebedarf, was wiederum größere Infarkte nach sich zieht (Goto et al. 1993). Die Gehirntemperatur korreliert mit der Körpertemperatur, die wir während der Versuche kontrolliert haben. Da keine interindividuellen Schwankungen der Körpertemperatur registriert werden konnte, ist dessen Einfluss auf die Infarktgröße auszuschließen.

Die Infarktgröße ist weiterhin von der Kollateraldurchblutung und damit vom Blutdruck abhängig. Ein niedriger Blutdruck bedingt eine schlechte Kollateraldurchblutung (Drummond et al. 1989, Zhu und Auer 1995). Obwohl wir den

Blutdruck in der vorliegenden Arbeit nicht kontrolliert haben, ist ein möglicher Einfluss auf die Variabilität der MCAO unwahrscheinlich, da die Versuchstiere durch die Verhaltenstests an die Untersucher gewöhnt waren und deshalb vor der Narkose während der MCAO nur geringem Stress ausgesetzt waren.

Darüber hinaus wird die Infarktgröße vom Serumglucose-Spiegel beeinflusst, wobei ein erhöhter Serumglucose-Spiegel in einer gesteigerten Glykolyse und einer darauf aufbauenden Laktatazidose mit der Folge einer größeren Hirnschädigung resultiert (Nedergaard 1987, Warner et al. 1992, Tan et al. 1997).

Darüber hinaus tragen systemische Parameter (arterieller Sauerstoffpartialdruck, arterieller Kohlendioxidpartialdruck und pH-Wert) zur Variabilität der MCAO bei (Coert et al. 1999). All diese Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen. Dennoch sind keine Variabilitäten zu erwarten, da wir den gleichen Stamm an Ratten verwendet haben.

Gleichermaßen bedeutsam ist das Gewicht der Ratten (Coyle 1982, Sutherland et al. 1996). Demnach ist es möglich, dass neurologische Defizite sowie die Lokalisation und das Ausmaß des Infarktes in größeren Ratten weniger schwer ausfallen, weil deren Blutgefäße wesentlich größer sind (Zea Longa et al. 1989). In der vorliegenden Arbeit weisen die Weibchen aller Gruppen ca. 60% des Körpergewichts der Männchen auf. Trotz des Gewichtsunterschiedes wurde bei beiden Geschlechtern die gleiche Fadenstärke verwendet. Dieses Vorgehen hat keinen Einfluss auf die Variabilität der MCAO, da die männlichen und weiblichen Kontrolltiere keine Unterschiede in Bezug auf das Infarktvolumen zwischen den Geschlechtern aufweisen (siehe 5.3.1, Abb. 10).

Die verwendeten Anästhetika können in hohen Dosen die Auslösung einer Hypothermie, eine Reduktion der Hirndurchblutung und eine Beeinflussung der Ischämie-Toleranz des Hirngewebes herbeiführen (Warner et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die Inhalationsnarkose mit einem Gasgemisch aus Isofluran, Lachgas und Sauerstoff über eine Maske (ohne Intubation) durchgeführt (siehe 4.1.2) und bei allen Versuchstieren gleich gehalten. Dennoch ist ein Auftreten interindividueller Unterschiede hinsichtlich der Narkosegasanreicherung möglich, da diese auch vom Fettgehalt der Versuchstiere abhängt. In der vorliegenden Arbeit gibt es allerdings nur geringe Schwankungen im Körpergewicht der Ratten, so dass die unterschiedlichen Fettgehalte keinen wahrscheinlichen Einflussfaktor für die Variabilität der MCAO darstellen.

6.1.5 Verwendete Glukokortikoide und Dosierungen

Zur Einhaltung der klinischen Relevanz erhielten die trächtigen Ratten am 19. und 20. Gestationstag (entsprechend etwa dem 7. Monat beim Menschen) via intraperitonealer Applikation die auf eine 70 kg schwere Schwangere adaptierte DM-Dosis ($2 \times 0,17$ mg/kg Körpergewicht) in Anlehnung an die Dosisempfehlungen der NIH (NIH Consensus Statement 2000) zur Förderung der Lungenreifung.

Synthetisch-hergestellte GK, wie beispielsweise DM oder Betamethason, haben eine spezifische Affinität zu den GR, welche in den meisten Hirnregionen vorhanden sind (Yang et al. 1990, Ahima et al. 1991, Cintra et al. 1994, Hassan et al. 1996). Das in Ratten endogen vorkommende Kortikosteron bindet primär an die MR (Hassan et al. 1996), wobei hohe physiologische Spiegel -wie sie unter Stress auftreten- zur Aktivierung der GR führen (Hassan et al. 1996, Tuor 1997). Das verwendete fluorierte GK DM hat im Gegensatz dazu keine relevante mineralokortikoide Wirkung. DM hat eine lange Halbwertszeit von 36 bis 72 Stunden im Vergleich zum Kortikosteron, welches eine wesentlich kürzere Halbwertszeit von 8 bis 12 Stunden hat (Tuor und Del Bigio 1996). Darüber hinaus hat DM einen stark hemmenden Einfluss auf die hypophysäre Corticotropin (ACTH)-Ausschüttung (Dornblüth 2004). DM hat eine 20-fach höhere Wirkpotenz als Kortikosteron (Lüllmann 2003).

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit zu erkennenden GK-Effekte und die damit verbundene erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Schlaganfällen sind allesamt GR-vermittelt. DM bindet nach antenataler Gabe isoliert an die GR und bewirkt die Sensitivierung und Hyperaktivität der Stressachse sowie die Programmierung einer Prädisposition von Erkrankungen im späteren Leben (siehe 2.2).

6.1.6 Histologische Aufbereitung und Färbemethoden

6.1.6.1 Gewebefixation

Sowohl die Fixation des Gewebes als auch die Dehydratation und das Einbetten der Gewebe-Blöcke in Paraffin bedingen jeweils eine Gewebeschrumpfung (Avendaño et al. 1995). In diesem Zusammenhang konnte Avendaño (Avendaño et al. 1995) eine lineare Schrumpfung des Katzenshirns um 23%, bedingt durch Perfusions- und Fixationsmaßnahmen, demonstrieren. Dieser Vorgang macht die Verwendung korrigierender Faktoren notwendig, sofern die realen Infarktvolumina ermittelt werden sollen. Jedoch stellt die Schrumpfung der Gewebe einen systematischen Fehler dar, wobei in dieser Hinsicht die jeweils nicht-ischämischen Hemisphären der Kontroll-

und der mit DM-vorbehandelten Tiere gleich groß sind. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass eine Gewebeschrumpfung die mit DM-vorbehandelten Versuchstiere nicht gesondert beeinflusst, was wegen der 2 Jahre zurückliegenden DM-Gabe auch unwahrscheinlich wäre. Somit ist der in Folge einer Gewebeschrumpfung auftretende systematische Fehler vernachlässigbar und nicht korrekturbedürftig.

Die Verwendung von fixiertem und eingebettetem Material hat einen bedeutenden Vorteil, welcher in einer hohen Qualität der resultierenden histologischen Präparate zu finden ist. Demnach kann eine exakte Darstellung der Hirnstrukturen auf zellulärer Ebene und somit die genaue Bestimmung des Infarktvolumens und der Penumbra erreicht werden (Avendaño et al. 1995). Derartige Präzision, als offensichtlicher Vorzug der Fixationsmethode, kann jedoch bei der Nutzung anderer Verfahrensweisen, wie der kortikalen Oberflächen-Schätzung des Infarkts oder der Verwendung unfixierter Schnitte, nicht erreicht werden (Avendaño et al. 1995). Aufgrund dessen wurde sich in der vorliegenden Arbeit für die Durchführung der Fixationsmethode sowie das Einbetten des Materials in Paraffin entschieden.

6.1.6.2 Immunhistologische CV-Färbung

CV zählt zu den basischen Oxazinfarbstoffen und bindet vorrangig an basophile Verbindungen wie DNA- oder RNA-Strukturen, wobei es im Besonderen auf die Anfärbung der Nissl-Substanz und der Nukleoli ausgelegt ist (Dornblüth 2004). Da im Nervengewebe diese Zellorganellen nur im Nervenzellkörper vorhanden sind, werden nur diese und nicht die Fortsätze angefärbt. Aufgrund der Anlagerung von RNA-haltigen Ribosomen an das raue endoplasmatische Retikulum, welches den „Nissl-Schollen“ entspricht, werden innerhalb der Nervenzellkörper vor allem diese angefärbt. Aufgrund dessen bezeichnet man diese Färbemethode auch als Nissl-Färbung, abgeleitet von dem Psychiater und Neurohistologen Franz Nissl (1860-1919). Die nach ihm benannten chromato- und basophilen Nissl-Schollen bzw. Tigroidschuppen zeichnen sich demnach durch einen hohen Gehalt an RNA aus und finden sich innerhalb des Zytoplasmas von Nervenzellen (Dornblüth 2004). Infolge der ischämischen Schädigung der Nervenzellen kommt es zu Veränderungen oder dem vollständigen Schwund der Nissl-Schollen (Chromatolyse). Elektronenmikroskopisch betrachtet erscheinen die Nissl-Schollen als ein

Membrangitter von rauem endoplasmatischen Retikulum (Schaldach 1980, Dornblüth 2004).

Damit ist die histologische Darstellung infarzierter Regionen von einer deutlichen Verringerung der CV-Anfärbbarkeit geprägt (Avendaño et al. 1995, Dornblüth 2004). Die Infarktareale sind mit Hilfe der CV-Färbung scharf abzugrenzen und deshalb leicht zu differenzieren, wie in der vorliegenden Arbeit ebenfalls festzustellen ist. Ferner finden sich frühe Stadien des Zellkernzerfalls (Karyolyse) sowie die einsetzende Zackenbildung und Schrumpfung der Neurone, wodurch sie einen annähernd dreieckförmigen Körperbau erlangen (Avendaño et al. 1995). Folglich steht die CV-Färbung als Standardmethode der Bestimmung von zerebralen Infarktarealen, inklusive der Darstellung des fortschreitenden Verlustes der neuronalen Architektur zur Verfügung (Pettigrew et al. 1996).

6.1.6.3 Immunhistochemische MAP2-Färbung

Im Jahr 1989 wurde die Immunhistochemie des MAP2 zum Nachweis früher, teilweise noch reversibler dendritischer Läsionen innerhalb eines Infarktareals und damit zur Kennzeichnung der Penumbra eingeführt (Kitagawa et al. 1989).

Normale Ratten zeigen eine MAP2-IR beinahe aller ihrer Nervenzellkörper und Dendriten, die sowohl innerhalb des Gehirns als auch im Rückenmark lokalisiert sind. In Neuronen bestehen Mikrotubuli-assoziierte Proteine aus 2 Klassen von Polypeptiden hohen Molekulargewichts, bezeichnet als MAP1 und MAP2. Sie begünstigen die Polymerisation von Tubulin in die Mikrotubuli und fördern in diesem Zusammenhang eine nachträgliche Stabilität (Li et al. 2000). Außerdem erfüllen diese Proteine des Zytoskeletts bedeutende Aufgaben im Zusammenhang mit der normalen neuronalen Integrität, indem sie die Nervenzellform und den intrazellulären Transport von Nährstoffen aufrecht erhalten (Bershadsky und Vasiliev 1989). MAP2 ist das Substrat einer second messenger-regulierten Proteinkinase und spielt in diesem Zusammenhang eine Rolle bei der Signaltransduktion (Miyazawa et al. 1993).

Es findet sich eine MAP2-Präsenz lediglich in Dendriten und im Perikaryon von Neuronen, wohingegen die MAP2-IR innerhalb von Axonen und nicht-neuronalen Zellen fehlt (Bernhardt und Matus 1984, Li et al. 2000). Infolge des Vorhandenseins von MAP2 in Dendriten, aber nicht in Axonen, kann es als ein selektiver Marker der postsynaptischen Seite verwendet werden (Bernhardt und Matus 1984, Li et al.

2000). Untersuchungen an normalen Rattengehirnen haben eine MAP2-IR lediglich in somato-dendritischen Kompartimenten der Neurone ergeben, wobei die Anfärbung innerhalb größerer und selbst feiner Dendriten wesentlich intensiver ausgefallen ist, als in den Zellkörpern. Das Polypeptid MAP2 ist hauptsächlich in adulten Ratten zu finden (Miyazawa et al. 1993, Popa-Wagner et al. 1999). Es unterläuft im zunehmenden Alter Veränderungen, die sich beispielsweise im Hippokampus als eine Verringerung der MAP-IR äußern, während demgegenüber im Kortex eine Reihe von morphologischen Differenzierungen sichtbar wird, wie beispielsweise die stärkere Streuung der MAP2-Fasern (Popa-Wagner et al. 1999). Es lassen sich 3 verschiedene Isoformen von MAP2 finden: MAP2a, MAP2b und MAP2c. MAP2a und MAP2b sind hochmolekulare Polypeptide (280 kiloDalton), während MAP2c ein niedrigmolekulares Protein (70 kiloDalton) ist und vorwiegend im sich entwickelnden Hirngewebe vorkommt. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete AK hat unselektiv diese 3 Isoformen gefärbt.

Eine abgelaufene Ischämie, beispielsweise infolge einer MCAO, resultiert in einem ausgedehnten Verlust der MAP2-Immunfärbung im Versorgungsgebiet der MCA (Li et al. 2000). Es findet sich eine enge Beziehung zwischen dem MAP2-Verlust und den morphologischen Veränderungen infolge der histologischen Schädigung (Miyazawa et al. 1993), wobei sich der MAP2-Verlust letztendlich größer darstellt als der Infarktkern. Auf diese Weise spiegeln Veränderungen in der MAP2-IR innerhalb zerebraler Schädigungen die Defizite der intrazellulären Regulation der Versorgung von Dendriten mit Nährstoffen wider. In diesem Zusammenhang ist bereits 1 Stunde nach der MCAO eine schnelle Reduktion der MAP2-IR erkennbar (Dawson und Hallenbeck 1996). Dieser MAP2-Verlust ist lange anhaltend und dadurch erklärt, dass Nervenzellen im Infarktkern zugrunde gegangen sind und darüber hinaus eine gestörte Produktion oder ein verstärkter Abbau von MAP2 erfolgt ist. Da die Areale mit MAP2-Verlust deutlich vom übrigen Hirngewebe abgrenzbar sind, ist der Gebrauch der MAP2-immungefärbten Schnitte zur morphometrischen Einschätzung des Ausmaßes eines Hirninfarkts und der Penumbra geeignet (Schwab et al. 1998, Li et al. 2000), wobei keine Differenzierung zwischen Infarktkern und Penumbra möglich ist. Im Gegensatz dazu können durch die CV-Färbung nur Zelluntergänge dargestellt werden, während die funktionell gestörten Neurone nicht zu differenzieren sind. In diesem Zusammenhang ist der Verlust der MAP2-IR -auch in der vorliegenden Arbeit- wesentlich größer als das mit einer konventionellen

histologischen Färbung dargestellte Areal irreversibel geschädigter Neurone (Schwab et al. 1998).

Der genaue Mechanismus, welcher den Verlust der MAP2-IR bedingt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Funktion des MAP2 als früher Marker dendritischer Läsionen innerhalb des Infarktareals und der Penumbra liegt in der hohen Energie-Empfindlichkeit des MAP2 begründet. MAP2 ist aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit ein „high turn-over Protein“, dessen Synthese stark energieabhängig ist (Schwab et al. 1998). Neben der verminderten Synthese kommt auch ein verstärkter Abbau des MAP2 in der Penumbra in Frage. MAP2 ist ein Substrat für die Kalzium-abhängige neutrale Protease Calpain, die im Zusammenhang mit einer Ischämie aktiviert wird (Pettigrew et al. 1996, Li et al. 2000). Darüber hinaus verursacht der intrazelluläre Kalzium-Anstieg die Aktivierung Kalzium-abhängiger Phosphatasen, wie beispielsweise die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin, die letztendlich die Dephosphorylierung des MAP2 bedingen (Miyazawa et al. 1993, Dawson und Hallenbeck 1996). Es bleibt unklar, ob die nicht gefärbten Areale einen MAP2-Verlust oder nur eine Dephosphorylierung des MAP2 widerspiegeln. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete AK ist lediglich in der Lage, die dephosphorylierte Form des MAP2 zu erkennen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die intraneuronale MAP2-Proteolyse einen hochsensitiven, frühen Marker zur Identifizierung dendritischer Läsionen verschiedenster ZNS-Schäden im Zusammenhang mit globaler oder fokaler Ischämie in der Ratte darstellt (Pettigrew et al. 1996, Li et al. 2000, Kharlamov et al. 2001). Aufgrund dessen kann in der vorliegenden Arbeit sowohl der Infarktkern als auch die Penumbra mit Hilfe der MAP2-Immunfärbung deutlich visualisiert werden.

6.1.6.4 Immunhistochemische GFAP-Färbung

Das GFAP ist ein wesentlicher Bestandteil des glialen Intermediärfilaments, wobei es hauptsächlich in Astrozyten vorzufinden ist (Bignami und Dahl 1974). Sofern die Astrozyten auf einen Gewebeschaden reagieren, zeichnen sie sich durch einen höheren Gehalt an Intermediärfilamenten aus, was sich wiederum in einer stärkeren GFAP-IR zeigt (Bignami und Dahl 1976). Eben diese Eigenschaften machen die GFAP-Immunfärbung zu einem wertvollem Marker astrozytärer Gliose, wodurch eine Beurteilung der astrozytären Antwort auf einen Gehirnschaden anhand der GFAP-

Veränderungen möglich wird (Latov et al. 1979, Herrera und Cuello 1992, Zhang et al. 1999). In diesem Zusammenhang spricht die gesteigerte GFAP-IR für die Umwandlung ruhender in reaktive Astrozyten in Folge einer zerebralen Ischämie (Eng und DeArmond 1981). Der Prozess dieser Astrozyten-Aktivierung wird auch reaktive Gliose genannt und beschreibt eine Reaktion mit spezifischen strukturellen und funktionellen Charakteristika, die begleitet ist von einer veränderten Expression vieler Gene (Pekny und Nilsson 2005, Pekny et al. 2007). Demnach charakterisiert der Begriff „Gliose“ einerseits die Hypertrophie der astrozytären Fortsätze und andererseits die Hochregulierung eines Teils des Zytoskeletts, auch bekannt als Intermediärfilamente (Nestin, Vimentin und GFAP) (Latov et al. 1979, Pekny et al. 2007). Die astrozytäre Reaktivität und damit die Zunahme der GFAP-Immunfärbung ist frühestens nach einem Tag detektierbar und bleibt minimal bis 21 Tage im Anschluss an eine MCAO nachweisbar (Butler et al. 2002). Dementsprechend war es auch in der vorliegenden Untersuchung 28 Tage nach der MCAO möglich, eine den Gehirnschaden begleitende Astrozyten-Aktivierung vor allem innerhalb des Caudoputamens und des Hippokampus aufzudecken.

Neben der Astrozytenproliferation kommt es zu einer Immigration verschiedener Blutzelltypen (Neutrophile und Makrophagen) und Mikroglia in das Infarktareal, die im nächsten Schritt zur Phagozytose geschädigter Neurone beitragen. Die mikrogliale Reaktion aktiviert ebenfalls die Astrozytose, die wiederum eine verstärkte GFAP-Markierung bedingt (Oehmichen et al. 2003). Darüber hinaus spielen die reaktiven Astrozyten eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase innerhalb des ZNS im Anschluss an eine zerebrale Ischämie oder andere Insulte (Yu et al. 1995). Des Weiteren verhindert die Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten eine exzitotoxische Akkumulation von Glutamat im Extrazellularraum (Swanson et al. 2004). Dies ist ein Prozess, der vermutlich das neuronale Überleben innerhalb der ischämischen Penumbra sichert (Swanson et al. 2004). In dieser Hinsicht sollen die Astrozyten eine protektive Wirkung gegenüber einer einsetzenden Ischämie ausüben, indem sie das extrazelluläre Glutamat abfangen (Petito et al. 1992).

Im Gegensatz dazu hat die Astrozytose auch negative Effekte. Die reaktiven Astrozyten beeinflussen das neuronale Überleben innerhalb der post-ischämischen Periode, indem sie zahlreiche Faktoren, wie z.B. NO, den Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Matrixmetalloproteinasen freisetzen, die schließlich im weiteren Verlauf zu einem verzögerten neuronalen Zelltod und einem Hirnödem beitragen können

(Swanson et al. 2004). Die Astrozyten beeinflussen entscheidend die Mediatoren des neuronalen Zelltodes während einer zerebralen Ischämie, beispielsweise in Form eines zunehmenden oxidativen Stresses und einer verstärkten Laktatazidose (Swanson et al. 2004).

Das mit der astrozytären Reaktivität einhergehende astrogliale Anschwellen hat ebenso negative Effekte. In diesem Zusammenhang wird ihm eine entscheidende Rolle in Bezug auf das Komprimieren zerebraler Kapillaren nachgesagt (Garcia et al. 1993, Zoppo 1994). Infolgedessen erscheint die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation zumindest teilweise als Resultat der Kompression von Kapillaren, bedingt durch das perivaskuläre Anschwellen und die Entwicklung eines zerebralen vasogenen Ödems (Zhang et al. 1999). Einen diesbezüglichen Hinweis bietet die vordergründige GFAP-Markierung im Umkreis großer Gefäße, deren Kapillaren eine verminderte Plasmaperfusion aufweisen (Zhang et al. 1999). So wird angenommen, dass angeschwollene Astrozyten bereits kurz nach einem Schlaganfall vorrangig die Gefäße verengen, die sich durch einen geringen Blutdruck auszeichnen, was wiederum eine verminderte Plasmaperfusion der Kapillaren innerhalb des sich anschließenden Gefäßbaumes nach sich zieht (Zhang et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wird bei den Kontrolltieren und den mit DM-vorbehandelten Ratten das Vorhandensein der Infarktnarbe vorrangig durch GFAP-positive Astrozyten dargestellt, welche sich reproduzierbar in Teilen des Kortex und Subkortex (insbesondere im Caudoputamen), im Corpus callosum und in der Capsula externa, insgesamt vor allem im Randbereich des eigentlichen Infarktkerns befinden. Da im nekrotischen Infarktkern die Astrozyteninfiltration fehlt, wird für die Bestimmung der Größe der Infarktnarbe in den einzelnen Schnitten zu der Fläche der mit der GFAP-Markierung dargestellten Astrozytose die Fläche des Infarktkerns (CV-Verlust) aufsummiert. Die GFAP-Immunfärbung ist -auch 28 Tage nach einer MCAO- ein wesentlicher Marker für die Bestimmung der astrozytären Gliose und somit der Infarktnarbe.

6.1.7 Lichtmikroskopische und bildverarbeitende

Infarktgrößenbestimmung

Neben den bereits erwähnten zahlreichen Varianten an verschiedenartigen MCAO-Modellen existiert eine Vielzahl von Methoden zur quantitativen Bewertung des resultierenden zerebralen Infarkts, die für sich genommen ebenso auf die Variabilität

der Ergebnisse Einfluss nehmen (Brint et al. 1988, Gundersen et al. 1988, Rosen und Harry 1990, Swanson et al. 1990). Folglich lassen sich die Resultate nicht nur aufgrund der Variabilität der MCAO, sondern auch aufgrund methodischer Besonderheiten bei der Auswertung schwer miteinander vergleichen. Zur Schätzung der Infarktgröße enthält die Mehrheit der quantitativen Methoden direkte Schätzwerte von dem zu betrachtenden zerebralen Areal. Bei der direkten Volumenmessung gibt es 3 verschiedene Möglichkeiten des Zugangs:

1. Manuelle oder Computer-assistierte Messungen der infarzierten kortikalen Oberfläche und der Infarktfläche im Querschnitt (beides in mm²) (Coyle et al. 1984, Chen et al. 1986),
2. Messungen von Serienschnitten der infarzierten Fläche des Gehirns und Bestimmung des Volumens (Bederson et al. 1986),
3. Volumenschätzungen mittels planimetrischer oder gravimetrischer Messungen multipler Schnitte innerhalb der Infarktzone oder der gesamten Hemisphäre (Osborne et al. 1987).

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Durchführung der 2. Methode festgelegt, da die Messung der infarzierten Fläche mit Hilfe von Serienschnitten des Gehirns (beginnend vom Block 2, entsprechend dem Bregma 2,20 mm bis hin zum Block 6, dem Bregma -4,52 mm entsprechend) eine effektive und reproduzierbare Variante darstellt. In Anlehnung an Literaturempfehlungen ist zur Messung der infarzierten Fläche eine Anzahl von 6 koronaren Schnitten im Abstand von 2 mm ausreichend, um die Infarktgröße mit genügender Genauigkeit zu bestimmen (Kitagawa et al. 1998, Nagel et al. 2004). Diese Form der Infarktvolumenbestimmung hat gegenüber einer gravimetrischen Messung den Vorteil, dass das begleitende Hirnödem nicht als Messfehler eingeht (Brint et al. 1988). Das Hirnödem würde zu einer Überschätzung des Infarktvolumens führen, da es für bis zu 22% des Infarktvolumens verantwortlich sein kann (Brint et al. 1988). Während der akuten Phase fokaler Ischämie scheint die Größe der ischämischen Läsion von 2 eng verwandten Phänomenen abzuhängen: einerseits vom Volumen des nekrotischen Gewebes und andererseits vom Volumen des zerebralen Ödems. Während der späten Phase (nach 28 Tagen) spielt das Hirnödem jedoch keine Rolle mehr (Persson et al. 1989). Das Ausmaß des Ödems nimmt mit steigender Okklusionszeit

zu, während die Infarktgröße in diesem Zusammenhang wesentlich ausgedehnter erscheint (Coert et al. 1999). Der relative Beitrag des Ödems an der scheinbaren Infarktgröße ist alles andere als einheitlich, so dass größere Infarktareale von einem relativ kleinem Ödem begleitet werden können und umgekehrt (Avendaño et al. 1995). Darüber hinaus sind Unterschiede zwischen der zeitlichen Entwicklung eines Ödems und der Zeitkurve von Volumenveränderungen des infarzierten Gewebes möglich. Demnach kommt das Ödem bereits 6 Stunden nach einer arteriellen Okklusion zum Vorschein, erreicht nach 24 Stunden sein Maximum und nimmt bis zum 3. Tag wieder auf den 6-Stunden-Wert ab (Lin et al. 1993). Das Infarktvolumen zeigt keinerlei signifikante Unterschiede zwischen dem 1. und 7. Tag nach der Okklusion (Garcia et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit ist im Zusammenhang mit der 28 tägigen Reperfusionzeit kein Hirnödem erkennbar. Die Infarktgröße verringert sich in dieser Phase infolge der Elimination toter Zellen durch Makrophagen und der Resorption (Persson et al. 1989). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete, relativ kurze Ischämiezeit von 30 Minuten sowie das zeitliche Intervall (28 Tage) bis zur Auswertung machen einen Einfluss des Ödems auf die Auswertung unwahrscheinlich. Überdies zeigen die alten Ratten in dieser späten Zeitspanne eine Schrumpfung der ipsilateralen Hemisphäre am ehesten aufgrund des gliösen Umbaus des Infarktvolumens (Wang et al. 2003), was in gleicher Weise in der vorliegenden Arbeit zu beobachten war. In diesem Zusammenhang hilft ein Bildverarbeitungsprogramm wie wir es verwendet haben (Scion Image 1.62, NIH public domain, USA), das infarzierte Gewebe zu detektieren und erhöhen folglich die Genauigkeit der ermittelten Ergebnisse (Swanson et al. 1990). Die Areale der gefärbten Schnitte mit einer optischen Dichte über einem festgelegten Schwellenwert werden automatisch in die Betrachtung einbezogen und mit gemessen. Dieses Verfahren ist geeignet, potentielle Fehler einer manuellen Auswertung zu vermeiden. Darüber hinaus erfolgt vorrangig die Volumenbestimmung der normalen, vitalen grauen Substanz, während -in Abhängigkeit von der verwendeten Färbemethode- das infarzierte Areal sekundär ermittelt wird. Dieser Zugangsweg ermöglicht die Reduktion der Ödem-bedingten Fehler, die das reale Ausmaß des infarzierten Gewebes verzerren und vergrößern können (Swanson et al. 1990). Dennoch sollte auf eine zusätzliche -obgleich einfache- Ausrüstung, wie beispielsweise der parallelen histologischen Kontrolle am Mikroskop, nicht verzichtet werden, da vor allem systematische Fehler, wie z.B. Färbungsinhomogenitäten, mit Hilfe der

Bildanalyse-Programme nicht kompensiert werden können. Diese Fehler können zur Variabilität der Resultate innerhalb der unterschiedlichen Versuchsgruppen beitragen (Avendaño et al. 1995).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Muster der zerebralen Hirnschädigung nach einer zerebralen Ischämie und Reperfusion

In der vorliegenden Arbeit resultiert die MCAO in einer zerebralen Schädigung mit einer maximalen Ausdehnung von der Bregma-Ebene 3,20 mm bis hin zur Bregma-Ebene -5,80 mm, wobei regelhaft die Regionen des lateralen Caudoputamen und des frontoparietalen Kortex (insbesondere der frontoparietale somatosensorische Kortex CX-2 und CX-3) betroffen sind. Es zeichnet sich jedoch eine gewisse Varianz hinsichtlich des Volumens der Infarkte ab. Demnach lässt sich bei insgesamt 7 der 32 Versuchstiere kein deutlicher Infarktbereich abgrenzen (darunter eine weibliche mit DM-vorbehandelte Ratte und jeweils 3 männliche und weibliche Kontrolltiere), währenddessen die übrigen Ratten in der Größe und Lokalisation relativ gleichmäßige Infarkte zeigen, die neben dem lateralen Caudoputamen und dem frontoparietalen Kortex, auch den Hippokampus, die Capsula externa und das Corpus callosum betreffen. Im Anschluss an eine MCAO ist der Kern der Läsion, welcher im Territorium der MCA gelegen ist, irreversibel geschädigt, während das perifokale Areal (die Penumbra) in Folge der reichlichen kollateralen Blutversorgung vorübergehend lebensfähig bleibt (Siesjö 1992). Während die konventionelle histologische CV-Färbung zur Detektion der irreversibel geschädigten Neurone innerhalb des Infarktkerns dient, sind mit Hilfe der MAP2-Immunfärbung im Unterschied dazu die funktionell gestörten Neurone, die innerhalb der Penumbra eines ischämischen Infarktes lokalisiert sind, nachweisbar (siehe 6.1.6.2 und 6.1.6.3). Im direkten Vergleich zwischen der CV-, MAP2- und der GFAP-Färbung, das heißt im Vergleich des Infarktkerns, der Summe aus Infarktkern und Penumbra und der Infarktnarbe ist in der vorliegenden Arbeit ein deutlich erhöhter MAP2-Verlust und das Vorhandensein tendenziell mehr GFAP-positiver Astrozyten im Vergleich zum CV-Verlust zu erkennen (siehe 5.3.4). In diesem Zusammenhang ist der Verlust der MAP2-IR als Ausdruck der Penumbra signifikant größer als das Volumen des Infarktkerns (CV-Verlust) und der Infarktnarbe (GFAP-Markierung) (siehe 5.3.4). Dagegen zeigt sich im Hippokampus beim Vergleich zwischen den nekrotischen

Zelluntergängen in der CV-Färbung und dem Verlust der MAP2-IR kein Unterschied innerhalb der Färbungen (5.5.3).

Bei Ratten fallen die Infarkte nach dem Verschluss der MCA und damit die funktionellen Ausfälle geringer aus als beim Menschen. Die MCA versorgt beim Menschen annähernd zwei Drittel einer Großhirnhemisphäre, weshalb es bei ausgedehnten Infarkten zu einer Kombination schwerer motorischer, sensibler und neuropsychologischer Störungen beim Menschen kommt (Diener et al. 2004). Aufgrund der Ischämie im Bereich der Capsula interna, des motorischen, prämotorischen und des somatosensiblen Kortex kann als Folge eines Mediaverschlusses beim Menschen eine kontralaterale Hemiparese und Hemihypästhesie beobachtet werden (Diener et al. 2004, Trepel 2004). Im Zusammenhang einer Mitbeteiligung der Sehstrahlung können kontralaterale Gesichtsfelddefekte im Sinne einer Hemianopsie resultieren (Diener et al. 2004). Während aphasische und apraktische Störungen häufig bei Infarkten der dominanten Hemisphäre auftreten, erscheinen demgegenüber Neglect-Syndrome vorrangig bei Infarkten der nicht dominanten Hemisphäre (Diener et al. 2004).

Im Allgemeinen sind die Versorgungsgebiete und die Anatomie der A. cerebri anterior, media und posterior in Ratten analog zu der beim Menschen (Coyle 1975, Yamori et al. 1976), wobei jedoch auch einige Abweichungen auffallen (siehe 6.1.4.1). Mögliche Unterschiede im Ausmaß des zerebralen Infarktes und im motorischen neurologischen Outcome hängen insbesondere von der Kollateralisierung der proximalen Seitenäste der MCA ab (Coert et al. 1999). Die MCA versorgt bei der Ratte einen Großteil des Neokortex (Coyle und Jokelainen 1982) sowie Teile der Basalganglien (z.B. das Caudoputamen) (Rieke et al. 1981). In Bezug auf die Kerne im Marklager des Großhirns ist in der vorliegenden Arbeit das Caudoputamen von dem Infarkt betroffen, währenddessen in den übrigen Basalganglien, wie beispielsweise dem Globus pallidus und Nucleus medialis thalami, keine Infarktlokalisationen nachweisbar sind. Ungleich zu den oben genannten Daten beim Menschen gibt es bei der Ratte mehr Kollateralgefäße zur MCA (Coyle und Jokelainen 1982). So lassen sich bei der Ratte zahlreiche interarterielle Anastomosen zwischen den distalen Ästen der A. cerebri anterior und der MCA finden, die für sich genommen einen regelrechten „Anastomosen-Kranz“ bilden (Coyle und Jokelainen 1982). Die Zahl dieser Anastomosen kann sich zwischen den verschiedenen Rattenrassen unterscheiden, ist aber unabhängig vom

Körpergewicht oder der Länge des Kortex (Oliff et al. 1997). Darüber hinaus gibt es weitere zerebrale Quellen für einen ausreichenden Kollateralfluss zur MCA bei der Ratte, wobei u.a. die zahlreichen Anastomosen zwischen der A. cerebri posterior und der MCA zu nennen sind (Coyle und Jokelainen 1982). Während die MCA beim Menschen wie bereits erwähnt ein besonders großes Areal innerhalb jeder Hemisphäre zu versorgen hat und ein Mediaverschluss deshalb zu ausgedehnten Infarkten führt, ist das Infarktareal bei einer MCAO im Rattenmodell weniger stark ausgeprägt. Dies liegt zum einen am oben beschriebenen Vorhandensein von wesentlich mehr Kollateralgefäßen zur MCA bei der Ratte und darüber hinaus an der relativ kurzen, 30-minütigen Okklusions- und Ischämiezeit in der vorliegenden Untersuchung.

Die MCA versorgt neben dem Caudoputamen und dem parietalen Kortex den Hippokampus, der maßgeblich an der räumlichen Gedächtnisbildung beteiligt ist (Butler et al. 2002). Die Okklusion der MCA zieht eine Ischämie in den besagten Hirnarealen nach sich. In der vorliegenden Arbeit zeigen sich bei dem gegenüber einer zerebralen Ischämie besonders vulnerablen Hippokampus vorrangig im Bereich der CA1- und CA2- sowie in der CA3-Region der ischämischen Hemisphäre mehr nekrotische Zelluntergänge bei den männlichen Kontrolltieren im Vergleich zu den Sham-Tieren (siehe 5.5.1). Ebenso verhält es sich bei Betrachtung der MAP2-Abschwächung innerhalb dieser Regionen (siehe 5.5.2), wobei kein Unterschied zwischen den einzelnen Färbungen auszumachen ist (siehe 5.5.3). Dieses Ergebnis ist typisch und analog zur Literatur, da eine zerebrale Hypoxie bzw. Ischämie insbesondere pyramidale Neurone innerhalb der CA1-Region des Hippokampus schädigt (Sapolsky und Pulsinelli 1985), während die Vulnerabilität gegenüber einer Ischämie von der CA1-/CA2- über die CA3-Region bis hin zum Gyrus dentatus abnimmt (Butler et al. 2002). Der Hippokampus ist beteiligt an der Koordination der Stimmungslage ebenso wie an Gedächtnis- und Lernprozessen (Scully und Otten 1995), weshalb man bei dessen Schädigung oftmals Defizite im Zusammenhang mit derartigen Gedächtnis- und Lernprozessen findet (Karhunen et al. 2003). Darüber hinaus ist der Hippokampus als ein Bestandteil des limbischen Systems in die Generierung eines bestimmten Verhaltens (z.B. Ängstlichkeit) involviert.

Bei der Ratte führt die MCAO zu einer lang anhaltenden Beeinträchtigung der sensomotorischen Funktion. Mitdoktoranden unserer Arbeitsgruppe haben bei den untersuchten Ratten das funktionelle und motorische Outcome überprüft. Im

Leitertest, der die motorische Funktion untersucht, zeigt sich bei den weiblichen und männlichen Kontrolltieren in der 1. und 4. Woche nach MCAO ein größerer Fehlerindex im Vergleich zu den jeweiligen Sham-Tieren. Darüber hinaus zeigt sich bei den Männchen eine stärkere motorische Beeinträchtigung als bei den Weibchen. Im Zylindertest, bei dem die Versuchstiere in einen Glaszylinder gegeben werden, um alle Bewegungen (z.B. Aufstellen, Seitwärtsbewegungen, Aufkommen, usw.) innerhalb von 3 Minuten dokumentieren zu können, zeigt sich in der 1. und 4. Woche nach MCAO eine Beeinträchtigung der motorischen Funktion, die insbesondere bei den männlichen Kontrolltieren nachweisbar ist.

Im Gegensatz dazu sind im Watermazetest in der 1. und 4. Woche nach MCAO keine kognitiven Defizite insbesondere des räumlich deklarativen Gedächtnisses zu beobachten. Eine vermutlich zu geringe hippokampale Schädigung durch den Schlaganfall bietet eine Erklärung für die unveränderte Gedächtnisleistung. Anders als bei unseren Ergebnissen sind in der Literatur am 2. und 14. Tag nach einer 90-minütigen MCAO auch Störungen der Leistungsfähigkeit beschrieben (Reglödi et al. 2003).

In den Open- und Dark Field-Verhaltenstests zur Testung auf Ängstlichkeit und Explorationsverhalten ist in der 1. und 4. Woche nach MCAO eine deutlich verminderte Aktivität nachweisbar. Diese verminderte Aktivität weisen auch die Sham-Tiere auf, sodass diese eher auf die OP als auf die zerebrale Ischämie zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Infarkte zu einer Störung der motorischen, aber nicht der kognitiven Funktion führen, was in der 1. und 4. Woche nach MCAO nachweisbar ist. In dieser Hinsicht ist vor allem der sensomotorische Kortex betroffen, während die hippokampale Schädigung, die zu kognitiven Störung führen würde, durch die Ratten gut kompensiert werden kann.

6.2.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie und der post-ischämischen Entzündungsreaktion

Viele Mechanismen führen im Zusammenhang mit einer zerebralen Ischämie zur neuronalen Schädigung (Adachi et al. 1998). So kommt es zu einer Störung der Energieversorgung im Sinne der Erschöpfung von Adenosintriphosphat (ATP)-Speichern, einer gestörten Ionen-Homöostase, einer zellulären Laktatazidose und letztendlich einer Veränderung der Permeabilität der BHS, wobei diese Vorgänge

von einer post-ischämischen Entzündungsreaktion begleitet sind (Raichle 1983, Iadecola und Alexander 2001).

6.2.2.1 Energiemangel und Zusammenbruch des Membranpotentials

Es ist eine notwendige Voraussetzung für das Leben und Überleben der Zellen, dass diese mit Hilfe eines osmotischen Mechanismus Ionen über die Zellmembranen hinweg pumpen. Jegliche zelluläre Erregung läuft zu Lasten von ATP ab, welches durch die Glykolyse im Zytoplasma der Zelle (zu einem geringeren Anteil) oder durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien (zu einem größeren Anteil) gebildet wird (Siesjö 1988). Das zentrale schädigende Ereignis im Zusammenhang mit einer zerebralen Ischämie ist die voranschreitende Erschöpfung von ATP, da aufgrund der verminderten Mikrozirkulation die Zufuhr energiereicher Substrate zum Gehirn und damit die ATP-Produktion verringert ist. Der Mangel an energiereichen Substraten führt zunächst zur Beeinträchtigung energieabhängiger Iontentransporter in Neuronen und Gliazellen, die für den Transport exzitatorischer Aminosäuren (z.B. Glutamat) (Bradford et al. 1987, Kauppinen et al. 1988, Szatkowski et al. 1990) bzw. Kalzium (Andreeva et al. 1991) aus dem Extrazellularraum verantwortlich sind und im nächsten Schritt zu einer Depolarisation von Neuronen und Gliazellen (Adachi et al. 1998). Aufgrund des neuronalen Energiemangels und der Unfähigkeit, den Konzentrationsgradienten für Ionen wie Natrium und Kalium, aber auch für exzitatorische Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat aufrecht zu erhalten, werden diese aus Neuronen in den Extrazellularraum freigesetzt, während ihre Aufnahme in die Astrozyten gehemmt wird (Schmidt-Kastner et al. 1990). Sowohl Aspartat als auch Glutamat aktivieren u.a. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) und metabotrope, ionenkanalunabhängige Glutamat-Rezeptoren (Siesjö 1988). Eine glutamat-vermittelte Stimulation dieser Rezeptoren und das fehlende Membranpotential führen zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentrationen (Hazell 2007), in dessen Folge eine Kaskade an schädigenden Prozessen abläuft. Damit sind die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren und die intrazelluläre Kalzium-Anreicherung entscheidend für einen ischämischen, neuronalen Schaden (Siesjö 1988). Insbesondere die CA1-Region des Hippokampus ist geprägt durch die Innervation glutaminerger Fasern, weshalb vor allem in dieser Region eine übermäßige Freisetzung von Glutamat während einer Ischämie zur neuronalen Schädigung führt (Adachi et al. 1998).

Parallel dazu verhindert eine Beeinträchtigung des Energiemetabolismus die ATP-abhängige Entfernung von Kalzium aus der Zelle und die ATP-abhängige Speicherung von Kalzium im endoplasmatischen Retikulum, was eine zusätzliche intrazelluläre Kalzium-Akkumulation bedingt. Einerseits in Folge eines deutlich erhöhten Kalzium-Einstromes vom Extrazellularraum in das postsynaptische Neuron, andererseits durch die verstärkte Freilassung von Kalzium aus intrazellulär-gelegenen Speichern (aus dem endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien), kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration. In Folge dessen werden eine Reihe von zytoplasmatischen und nukleären Prozessen in Gang gesetzt, die die Entstehung eines Gewebeschadens erheblich beeinflussen. Hierzu gehört zunächst die Aktivierung von Phospholipasen, Endonukleasen und Proteasen, wobei letztere für den Abbau von extrazellulären Matrixproteinen oder zytoskelettalen Proteinen verantwortlich sind (Hazell 2007). Diese Enzyme führen im weiteren Verlauf beispielsweise über eine Proteolyse und Protein-Phosphorylierung zur Dysfunktion von Rezeptoren und Ionenkanälen mit dem Ergebnis einer gestörten Membranpermeabilität und einer sich darauf aufbauenden Zellnekrose (Siesjö 1988). Dieser enzymatische Prozess gipfelt schließlich in einer zunehmenden Funktionseinschränkung von Proteinen und Lipiden verbunden mit einer nachteiligen Beeinflussung des Zytoskeletts und Membransystems, in dessen Folge ein irreversibler neuronaler Schaden entsteht (Siesjö 1988, Adachi et al. 1998). Eine weitere Folge der erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentration ist die Initiierung einer mitochondrialen Dysfunktion, wobei die Kalzium-Überlastung in den Mitochondrien zu deren irreversiblen Schädigung beiträgt (Hazell 2007). Darüber hinaus ist eine Kalzium-bedingte Aktivierung der Phospholipase A₂ und Cyclooxygenase zu beobachten, die die Produktion freier Radikale (z.B. reaktive Sauerstoff-Radikale) als potentiellen Mechanismus für die Zellmembranschädigung nach sich ziehen (Hazell 2007). Die entstehenden freien Radikale, vor allem reaktive Sauerstoffradikale und NO, tragen zu der inflammatorischen Kaskade im Anschluss an eine zerebrale Ischämie entscheidend bei, indem deren übermäßige Produktion einen zytotoxischen Effekt über die Hemmung der ATP-produzierenden mitochondrialen Enzyme und folglich die Inaktivierung zahlreicher Proteine ausübt (Yi et al. 2007).

Neben dem während einer zerebralen Ischämie auftretenden Energiemangel steht vor allem die gestörte Ionen-Homöostase im Vordergrund (Raichle 1983). In Folge

dieses neuronalen Energiemangels und der Unfähigkeit, den Ionengradienten über die Natrium-Kalium-ATPase und damit das Ruhemembranpotential zu erhalten bzw. nach synaptischer Erregung wieder aufzubauen, kommt es zu einem deutlich überwiegenden Natrium- und Chlorid-Einstrom in die Zellen im Vergleich zum Kalium-Ausstrom (Siesjö 1988). Dem Ioneneinstrom in die Zellen folgt passiv Wasser, ein Vorgang, der über eine Zellschwellung ein zytotoxisches Ödem bedingt (siehe 6.2.2.4). Damit assoziiert ist ein Anstieg des Sauerstoff- und Glucose-Verbrauchs, wobei die Substratverfügbarkeit aufgrund der Gewebeschwellung stark eingeschränkt ist (Raichle 1983).

6.2.2.2 Laktatazidose

Weiterhin typisch für eine zerebrale Ischämie ist das Auftreten einer erhöhten Laktatkonzentration im Gewebe, welche sich im Zusammenhang mit der ablaufenden anaeroben Glykolyse und einem abfallenden pH-Wert im Gewebe entwickelt (Raichle 1983). Ursächlich hierfür ist die Entstehung von Laktat- und Wasserstoff-Ionen als zusätzliche Stoffwechselendprodukte aus Glucose -neben ATP- im Rahmen der Glykolyse (Siesjö 1988). Die entstehende Gewebeazidose trägt zu einer verstärkten Wirkung der freien Radikale bei und ist darüber hinaus assoziiert mit der Entwicklung eines Ödems (Siesjö 1988). Aus diesem Grund führt der Abfall des pH-Wertes zu einer Vergrößerung der ischämischen Läsion.

6.2.2.3 Störungen der Proteinsynthese

Sowohl der bereits angesprochene Energiemetabolismus und die direkt damit gekoppelte Funktion der Ionenpumpen (siehe 6.2.2.1) als auch die Proteinsynthese benötigen als basale Hirnfunktionen eine bestimmte persistierende zerebrale Mindestdurchblutung (Mies et al. 1991). In dieser Hinsicht zeigt die Reduzierung der kortikalen Hirndurchblutung auf 50 bis 60% der Kontrollwerte, dass in diesem Bereich eine beginnende Störung der neurophysiologischen Funktion und der Proteinsynthese einsetzt (Jacewicz et al. 1986). Im Gegensatz dazu nimmt beispielsweise der ATP-Gehalt erst bei einer Durchblutungssenkung auf 45% ab (Eklöf und Siesjö 1973). Aufgrund dessen verwundert es nicht, dass nach einer MCAO bei Katzen das Areal mit einer gestörten Proteinsynthese wesentlich größer als das Areal mit verminderter ATP- und Glucose-Utilisation ist (Hossmann et al. 1985). Darauf begründet sich die auch in der vorliegenden Arbeit verwendete

Immunfärbung mit MAP2 als Marker für frühe, teilweise noch reversible dendritische Läsionen innerhalb eines Infarktareals und damit zur Kennzeichnung der Penumbra (Li et al. 2000). Die Ischämieempfindlichkeit von MAP2 erklärt sich über dessen kurze Halbwertszeit (Schwab et al. 1998). So ist bereits zwischen 1 und 6 Stunden nach permanenter Okklusion der MCA eine schnelle Reduktion der MAP2-IR erkennbar, wobei der MAP2-Verlust im Laufe der Zeit weiter zunimmt (Dawson und Hallenbeck 1996, Pettigrew et al. 1996). Im Gegensatz dazu sind bei der konventionellen histologischen CV-Färbung die funktionell gestörten Neurone, die innerhalb der Penumbra eines ischämischen Infarkts lokalisiert sind, nicht zu differenzieren. In diesem Zusammenhang ist das mit einer konventionellen histologischen Färbung dargestellte Areal irreversibel geschädigter Neurone -auch in der vorliegenden Arbeit- wesentlich kleiner als der Verlust der MAP2-IR (Schwab et al. 1998). Deshalb ist die Verwendung der MAP2-Immunfärbung zur morphometrischen Einschätzung des Ausmaßes eines Hirninfarkts inklusive der Penumbra geeignet (Schwab et al. 1998, Li et al. 2000).

6.2.2.4 Hirnödementwicklung

Im Zusammenhang mit einer zerebralen Ischämie entsteht unmittelbar ein zytotoxisches Hirnödem (Klatzo 1967, Unterberg et al. 2004). Dieses ist charakterisiert durch die fortlaufende intrazelluläre Akkumulation von Wasser, welche zur neuronalen und glialen Zellschwellung führt. Ursächlich hierfür können verschiedene Mechanismen sein, wie beispielsweise die erhöhte Permeabilität der Zellmembran gegenüber Natrium und Kalium oder das im Zusammenhang mit einem Energiemangel auftretende Versagen der aktiven Ionenpumpen, z.B. der Natrium-Kalium-ATPase. Dem Natrium- und Chlorid-Einstrom in die Zellen folgt passiv Wasser, ein Vorgang, der über eine Zellschwellung ein zytotoxisches Ödem bedingt (Unterberg et al. 2004).

Daneben führt die Leukozyten-vermittelte Ausschüttung chemischer Mediatoren zu einer Erhöhung der Permeabilität der BHS und somit zu einem über mehrere Stunden verzögert einsetzendem, vasogenen zerebralen Ödem mit Erhöhung des intrakraniellen Druckes (Klatzo 1967, Heinel et al. 1994, Unterberg et al. 2004). Dieses beim Zusammenbruch der BHS auftretende extrazelluläre Hirnödem ist gekennzeichnet durch die Akkumulation eines proteinreichen Exsudats im Extrazellularraum, welches sich in Folge einer gesteigerten Permeabilität der

kapillären Endothelzellen gegenüber Albumin und anderen Plasmaproteinen entwickelt (Betz et al. 1989).

6.2.2.5 Inflammatorische Reaktion

Unabhängig von den beschriebenen akuten Effekten einer zerebralen Ischämie können inflammatorische Reaktionen beobachtet werden, die innerhalb von Stunden im Anschluss an einen zerebralen Insult beginnen und über einige Tage andauern können (Yi et al. 2007). Diese post-ischämische Entzündungsreaktion wird verdächtigt, zum neuronalen Zelltod in Folge einer zerebralen Ischämie beizutragen (Zheng und Yenari 2004, Yi et al. 2007). Die zerebrale Ischämie ist von einer deutlichen zerebralen Entzündungsreaktion begleitet, wobei diese durch eine Ischämie-induzierte Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und weiteren Entzündungsmediatoren (z.B. NO) angekurbelt wird (Iadecola und Alexander 2001). In diesem Zusammenhang produzieren die geschädigten Neurone und Gliazellen u.a. Zytokine und Chemokine, wie z.B. den TNF α und die Interleukine 6 und 1 β . Diese Faktoren leiten wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen am vaskulären Endothel ein, die die Leukozytenadhäsion vermittelt. Leukozyten werden erst in Folge einer Entzündung oder Infektion zum Eindringen in das betroffene Gewebe rekrutiert (Huang et al. 2006), wobei ein bedeutender Trigger die genannte Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. Selektine und Integrine) darstellt. Nachdem die Endothelzellen innerhalb zerebraler Blutgefäße zur Produktion dieser Adhäsionsmoleküle stimuliert werden, erleichtert beispielsweise das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) auf kapillären Endothelzellen und Leukozyten die Adhäsion und transendotheliale Migration von peripher zirkulierenden Leukozyten (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) in das beeinträchtigte Hirngewebe (Yi et al. 2007). Zunächst kann somit eine Infiltration von Leukozyten in das ischämische Areal, verbunden mit einer Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen und Astrozyten beobachtet werden (Iadecola und Alexander 2001). Diese Leukozytenadhäsion bewirkt über die Verringerung der mikrovaskulären Flussraten, im Sinne eines „Verstopfens“ des betroffenen Gefäßes, die Verstärkung eines zerebralen Gewebeschadens (Iadecola und Alexander 2001). In dieser Hinsicht wird in den betroffenen Kapillaren zunächst die Hirndurchblutung beeinträchtigt und darüber hinaus die Freilassung einer großen Menge neurotoxischer Substanzen (z.B. pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine und freie Radikale) in Folge des Übertretens

der Leukozyten in das post-ischämische Hirnparenchym eingeleitet (Yi et al. 2007). Ebenso wie Neurone und Gliazellen produzieren die aktivierten Leukozyten demnach Zytokine und Chemokine im geschädigten Hirngewebe und leiten somit die Wanderung der aus dem Blut stammenden Entzündungszellen zum ischämischen Gebiet ein. In diesem Zusammenhang wird eine Beteiligung von Leukozyten in Verbindung mit einem zerebralen Infarkt in Folge einer Ischämie und Reperfusion vermutet (Heinel et al. 1994). Demnach sind die Leukozyten ein entscheidender Bestandteil der inflammatorischen Kaskade in Folge einer zerebralen Ischämie und zudem verantwortlich für die Exazerbation zellulärer Gewebeuntergänge im Anschluss an eine Reperfusion. Leukozyten akkumulieren im Gehirn insbesondere unter Bedingungen einer niedrigen Hirndurchblutung, wobei sie entweder aufgrund der Zell-Zell-Adhärenz oder der Anschwellung des Endothels zu einer weiteren Verschlechterung der Hirndurchblutung führen (Heinel et al. 1994). Dieser Vorgang liefert eine Erklärung für die Leukozyten-bedingte Vermehrung des zerebralen Schadens, wobei darüber hinaus die Ausschüttung der chemischen Mediatoren zu einer Erhöhung der Permeabilität der BHS führt und somit in einem vasogenen zerebralen Ödem (siehe 6.2.2.4) mit Erhöhung des intrakraniellen Druckes resultiert (Heinel et al. 1994). Ungeachtet der noch unklaren Pathogenese tragen Leukozyten somit zu einem irreversiblen ischämischen Hirnschaden bei, der sich in Form eines größeren Infarktareals darstellt (Heinel et al. 1994). Daneben kann eine Aktivierung lokaler Entzündungszellen (z.B. Mikroglia) im Gehirn in Antwort auf einen ischämischen Insult beobachtet werden, in dessen Folge die Expression verschiedener inflammatorischer Gene eingeleitet wird. Diese führen wiederum zur lokalen Entstehung zahlreicher Zytokine (z.B. Interleukin 1 und Interleukin 6), die wie bereits erwähnt eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen bedingen (Zheng und Yenari 2004). Letztendlich trägt die Entzündungsreaktion vermutlich zum späten Stadium der ischämischen Schädigung bei und resultiert darüber hinaus in einer Verschlechterung des neurologischen Outcomes (Iadecola und Alexander 2001).

Nichtsdestotrotz wird der zerebralen Entzündungsreaktion auch eine physiologische Bedeutung zugesprochen. Demnach sind Makrophagen und Zellen der Mikroglia nach einer abgelaufenen zerebralen Ischämie für das Abräumen von nekrotischen Bruchstücken verantwortlich (Yi et al. 2007).

6.2.3 Einfluss des Geschlechts auf das Hirnvolumen und die ischämische Hirnschädigung

Hirnvolumen

In der vorliegenden Arbeit sind bei den Sham-Tieren keine Unterschiede im Vergleich der Hemisphären-Größen zwischen den Geschlechtern erkennbar. Während sich in der Literatur für das Körpergewicht der Weibchen Größenangaben von ca. 70% des von denen der Männchen finden lassen (Carswell et al. 1999), weisen in der vorliegenden Arbeit die Weibchen aller Gruppen ca. 60% des Körpergewichts der Männchen auf. Das Hirnvolumen der Weibchen ist nicht kleiner im Vergleich zu den jeweiligen Männchen.

Die männlichen Kontrolltiere weisen ein größeres Hirnvolumen im Vergleich zu den Sham-Tieren auf. Diese Volumenzunahme beider Hemisphären bei den männlichen Kontrolltieren spricht am ehesten für eine Wassereinlagerung, da normalerweise das von einem Infarkt betroffene Hirngewebe in Folge des gliösen Umbaus narbig zusammenschrumpft (Zhang et al. 1999). Eine derartige Zunahme des Hirnvolumens ist bei den weiblichen Kontrolltieren nicht nachweisbar, weshalb bei ihnen beide Hemisphären, die nicht-ischämische sowie die ischämische, kleiner im Vergleich zu den Männchen sind und sich nicht von dem Hemisphären-Volumen der weiblichen Sham-Tiere unterscheiden. Das lässt vermuten, dass die Wassereinlagerung der nicht-ischämischen und der ischämischen Hemisphäre spezifisch für die männlichen Kontrolltiere ist.

Bei den mit DM-vorbehandelten Ratten unterscheidet sich das Hemisphären-Volumen zwischen den Geschlechtern nicht, wobei sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen die nicht-ischämische Hemisphäre signifikant größer ist im Vergleich zu den Sham-Tieren (siehe 6.2.4.1). Die fehlende Zunahme der Hemisphären-Größe bei den mit DM-vorbehandelten Ratten auf der ischämischen Seite geht mit den größeren Infarkten bei diesen Tieren einher. Der gliöse Umbau des Infarktareals bedingt eine Schrumpfung des Infarktgewebes und damit der gesamten Hemisphäre, die offensichtlich durch eine Wassereinlagerung (Hirnödem) kompensiert wurde, aber das Hemisphären-Volumen letztlich nicht vergrößert.

Infarktvolumen

Bei den männlichen und weiblichen Kontrolltieren zeigen sich zwischen den Geschlechtern keine Unterschiede in Bezug auf das Infarktvolumen, während bei der

mit DM-vorbehandelten Gruppe ein tendenziell größeres Infarktvolumen bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen beobachtet werden kann (siehe 5.3.1).

Tierversuche werden zumeist an jungen, männlichen Tieren vorgenommen, wobei deren Resultate oftmals auf beide Geschlechter verallgemeinert werden. Die Rolle von Geschlechtsunterschieden im Zusammenhang mit einem ischämischen zerebrovaskulären Ereignis bleibt nach wie vor umstritten. Experimentelle Schlaganfall-Studien an Tieren sind in Bezug auf Geschlechtsunterschiede im Ausmaß der Infarktgröße umstritten (Vergouwen et al. 2000, Gibson et al. 2006). Es ist ein neuroprotektiver Effekt des Östrogens während einer zerebralen Ischämie erkannt worden (Gibson et al. 2006). Aufgrund dessen scheinen die weiblichen Versuchstiere durch die höheren Östrogen-Konzentrationen mit einem gewissen endogenen Schutz gegenüber einem ischämischen Schaden ausgestattet zu sein (Gibson et al. 2006). Allerdings ist der Östrogen-bedingte Schutz nicht bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten adulten Ratten zu vermuten, da sich diese bereits in der Menopause befinden und die Östrogenwirkung damit nur eine untergeordnete Rolle spielt.

6.2.4 Effekte einer antenatalen Glukokortikoid-Therapie

6.2.4.1 Dexamethason-Effekte auf die Hemisphären-Größe

Wie bereits im Kapitel 6.2.3 erwähnt, zeigt sich in der vorliegenden Studie eine größere nicht-ischämische Hemisphäre bei den männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren (siehe 5.4). Im Gegensatz dazu sind bei den männlichen Kontrolltieren beide Hemisphären größer als bei den Sham-Tieren, während bei den weiblichen Kontrolltieren keine Unterschiede im Vergleich zu den Sham-Tieren erkennbar sind (siehe 5.4).

Die fehlende Zunahme der Hemisphären-Größe bei den mit DM-vorbehandelten Ratten auf der ischämischen Seite stimmt mit den größeren Infarkten bei diesen Tieren überein. In dieser Hinsicht kommt es im Bereich des größeren Infarktareals zu einem vermehrten gliösen Umbau, mit der Folge einer zunehmenden Schrumpfung des Infarktgewebes und daraus resultierend der gesamten Hemisphäre. Diese Schrumpfung wurde offensichtlich durch eine Wassereinlagerung im Sinne eines Hirnödems kompensiert, hat jedoch das Hemisphären-Volumen letztlich nicht vergrößert. Derartige Veränderungen sind somit am ehesten auf ein sich entwickelndes Gehirnödem zurückzuführen, welches vermutlich in beiden

Hemisphären bei den männlichen und weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten und bei den männlichen Kontrolltieren vorhanden war, aber durch die genannten Schrumpfungsprozesse maskiert wurde. Diese Resultate bezüglich des entstehenden Ödems und der ablaufenden Schrumpfungsprozesse befinden sich im Einklang mit der Literatur, wobei nach 24-stündiger permanenter Okklusion der MCA eine bis zu 45% größere ischämische Hemisphäre registriert wurde im Vergleich zur nicht-ischämischen Hemisphäre (Avendaño et al. 1995). Andere Studien an neonatalen Ratten mit einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung nach 2-stündiger Okklusion der rechten A. carotis zeigen, dass die Größe des Gehirns durch die Behandlung mit DM nicht beeinflusst wird (Tuor und Del Bigio 1996). Nichtsdestotrotz besteht die Möglichkeit, dass das begleitende Ödem das infarzierte Gewebe in einer anderen Art und Weise durch Perfusions- und Fixationsmaßnahmen schrumpfen lässt, als dies bei normalem Gewebe der Fall ist (Avendaño et al. 1995). Dies ist nur ein möglicher Ansatzpunkt für die Erklärung der signifikant größeren kontralateralen, nicht-ischämischen Hemisphäre bei den mit DM-vorbehandelten Tieren.

6.2.4.2 Dexamethason-Effekte auf eine ischämische Hirnschädigung

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein neurotoxischer Effekt der antenatalen GK-Gabe bei adulten Ratten. Sowohl der erhöhte zerebrale Vasotonus, der durch die antenatale GK-Behandlung induziert wird (siehe 6.2.5.1) als auch die sekundäre Entzündungsreaktion im ZNS sind bedeutende Einflussfaktoren auf die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung. So weisen die männlichen mit DM-vorbehandelten Ratten ein signifikant größeres Infarktvolumen auf als die männlichen Kontrolltiere. Auch die weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten zeigen die Tendenz eines größeren Infarktvolumens im Vergleich zu den weiblichen Kontrolltieren (siehe 5.3.1). Parallel dazu ist auch die Penumbra des zerebralen Infarktes, dargestellt als MAP2-Verlust, bei den mit DM-vorbehandelten Männchen und Weibchen signifikant größer als bei den jeweiligen Kontrolltieren (siehe 5.3.2). Daneben sind in beiden Geschlechtern tendenziell mehr GFAP-positive Astrozyten bei den mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren zu finden (siehe 5.3.3).

Das vergrößerte Hirninfarktvolumen spiegelt sich auch beim motorischen Schlaganfalloutcome wider. Diesbezüglich erzielten Mitdoktoranden bei motorischen

Tests an den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ratten zahlreiche interessante Ergebnisse. In der 1. und 4. Woche nach MCAO wurden der Leiter- und der Zylindertest durchgeführt. Beim Leitertest wird anhand der Art der Pfotenplatzierung auf den Sprossen einer horizontal gestellten Leiter die motorische Funktion überprüft, während beim Zylindertest zur Beurteilung der sensomotorischen Funktion die Bewegungen in einem Glaszylinder (z.B. Aufstellen, Seitwärtsbewegungen, Aufkommen, usw.) analysiert werden. Die mit DM-vorbehandelten Männchen und Weibchen zeigen einen erhöhten Fehlerquotient im Leitertest und mehr Bewegungseinschränkungen im Zylindertest als Ausdruck einer motorischen Störung der Körperseite kontralateral zum Hirninfarkt im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die mit Hilfe der genannten motorischen Testungen gewonnenen Ergebnisse stimmen mit denen aus der histologischen Auswertung überein, bei der die mit DM-vorbehandelten Tiere größere Infarkte zeigen als die Kontrolltiere. Darüber hinaus sind bei den männlichen Kontroll- und mit DM-vorbehandelten Tieren ein deutlich größerer Fehlerquotient im Leitertest und mehr Bewegungseinschränkungen im Zylindertest als bei den jeweiligen Weibchen zu beobachten. Dies spiegelt sich bei der mit DM-vorbehandelten Gruppe in der histologischen Auswertung wider, da die Männchen hier ein tendenziell größeres Infarktvolumen als die Weibchen zeigen. Im Gegensatz dazu gibt es bei den männlichen und weiblichen Kontrolltieren keine Unterschiede in Bezug auf das Infarktvolumen zwischen den Geschlechtern.

Bei von Mitdoktoranden durchgeführten Verhaltenstests an den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ratten wurden ebenso interessante Erkenntnisse gewonnen. So zeigen die antenatal mit DM-vorbehandelten Ratten keine Verhaltensauffälligkeiten im Open und im Dark Field Versuch im Vergleich zu den Kontrolltieren, wobei bei allen Ratten nach dem Schlaganfall eine verminderte Aktivität zu beobachten ist. Der fehlende Unterschied im Aktivitätsgrad zwischen den Kontroll- und mit DM-vorbehandelten Tieren verdeutlicht, dass das antenatal verabreichte DM keinen Einfluss auf die Entwicklung ängstlichen Verhaltens nach einem Schlaganfall nimmt. Im Watermazetest sind ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und mit DM-vorbehandelten Tieren nachweisbar, da alle Ratten eine durch den Schlaganfall oder die antenatale DM-Behandlung unbeeinflusste Lernkurve und nach Wiederholung des Tests eine langfristige Konsolidierung des räumlich Erlernten vorweisen. Es ist zu vermuten, dass die Okklusionszeit der MCA in der vorliegenden Arbeit mit 30 Minuten zu kurz war, um den Grad der hippocampalen Schädigung

hervorzurufen, der ein räumliches Lerndefizit zur Folge gehabt hätte. Bei den mit DM-vorbehandelten Tieren zeichnet sich beim Test auf eine Depression ein signifikant geringerer Flüssigkeitskonsum und ein überproportional geringerer Glucose-Lösungskonsum im Vergleich zu den Kontrolltieren ab. Dieses Resultat lässt die antenatale DM-Behandlung als Prädisposition für eine Depression vermuten.

Somit führt die antenatale DM-Gabe bei der Ratte im Senium zu keinem gesteigerten ängstlichen Verhalten und zu keiner kognitiven Störung, prädisponiert aber für die Entwicklung depressiver Eigenschaften. Darüber hinaus können in Folge der antenatalen DM-Gabe bei den männlichen und weiblichen Ratten vergrößerte Schlaganfälle verbunden mit einem verschlechterten motorischen Outcome beobachtet werden.

6.2.5 Potentielle Mechanismen der neurotoxischen Glukokortikoid-Effekte

6.2.5.1 Fetale Programmierung

Fetale Programmierung der Vasokontraktilität

Eine mögliche Ursache für die Exazerbation eines ischämischen zerebralen Schadens nach einer antenatalen GK-Behandlung ist die Fetale Programmierung der vaskulären Funktion durch GK (Hadoke et al. 2006). So führen erhöhte GK-Spiegel beim Feten vermutlich über den Mechanismus der Fetalen Programmierung zu Veränderungen der peripheren Gefäßfunktion, was wiederum die Erhöhung des Blutdrucks begünstigt (Hadoke et al. 2006). Demnach beeinflusst die antenatale GK-Gabe sowohl die Funktion des Endothels (über eine Hemmung der Produktion des vom Endothel abstammenden NO) als auch die der glatten Gefäßmuskelzellen (durch eine selektive Hochregulierung deren kontraktile Rezeptoren) (Anwar et al. 1999). Dies führt zu einer erhöhten Vasokontraktilität mit der Folge der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen im Alter (Hadoke et al. 2006). Die arterielle Hypertonie stellt beim Erwachsenen einen wichtigen Risikofaktor für das Auftreten einer Arteriosklerose dar, die wiederum die Entstehung eines ischämischen zerebralen Insultes entscheidend begünstigt (Diener et al. 2004).

Fetale Programmierung des Metabolismus

Perinatal erhöhte GK-Spiegel, die unter natürlichen Bedingungen Ausdruck von mütterlichem Stress sind, führen zu einer Verminderung der Zahl insulinproduzierender Betazellen im Pankreas und damit zu einer fortbestehenden Änderung der Aktivität von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese und Glykolyse (McMillen und Robinson 2005). Indem die Insulinsensitivität vermindert und die Funktion der Adipozyten beeinflusst wird, soll der Organismus auf ungünstige Umweltbedingungen im späteren Leben vorbereitet werden. Wird letztendlich postnatal eine übermäßige oder selbst normale Nahrungsmenge dargeboten, kommt es zu einer Überforderung des Systems und zur Entwicklung von Adipositas, Arteriosklerose und eines Diabetes mellitus Typ II. Diese metabolischen Veränderungen können im weiteren Verlauf zur Entstehung kardio- und zerebrovaskulärer Erkrankungen (wie z.B. einem Schlaganfall) beitragen.

Fetale Programmierung der Stressachse

Es gibt 2 Möglichkeiten wie sich eine antenatale GK-Gabe auf die adulte Hirnfunktion auswirken kann: Erstens durch eine Störung der Hirnentwicklung und zweitens durch eine Programmierung physiologischer Systeme (z.B. Neurotransmittersysteme) im späteren Leben.

Kortisol ist für die normale Hirnentwicklung essentiell (Matthews 2000), hat in supraphysiologischen Dosierungen neurotoxische Effekte und führt zu einer Störung der Reifung des ZNS (siehe 2.3.1). Erhöhte GK-Spiegel führen über eine Störung der Hirnreifung zu strukturellen Veränderungen des Gehirns und im Erwachsenenalter zu Störungen der neuronalen Erregbarkeit und der Funktion von Neurotransmittersystemen (Slotkin et al. 1996). Auf struktureller Ebene ist eine Hemmung der Neuroneogenese bis hin zur neuronalen Degeneration zu beobachten (Uno et al. 1994). Darüber hinaus ist die gestörte Sensitivität der HHN-Achse mit einer Änderung der Aktivität verschiedener Neurotransmittersysteme im späteren Leben assoziiert. So führen antenatal erhöhte GK-Spiegel u.a. zu einem gesteigerten zerebralen Serotoninstoffwechsel im späteren Leben. Der daraus resultierende verminderte Serotoningehalt ist ein Charakteristikum depressiver Erkrankungen (Slotkin et al. 1996). Diese Vorgänge spiegeln einen möglichen Mechanismus zur Entstehung von Verhaltensauffälligkeiten, kognitiven Defiziten und psychomotorischen Störungen im Alter wider (Lemaire et al. 2000). Die Störung der

Hirnreifung hat in der vorliegenden Arbeit vermutlich keinen Effekt auf die Größe des Schlaganfalls.

Programmierende Effekte auf die Hirnfunktion treten ohne strukturelle Abnormitäten während der Entwicklung auf. Ein Beispiel hierfür ist die Programmierung der Stressachse. In Folge einer permanenten Desensitivierung der in die negative Rückkopplung der HHN-Achse involvierten GR im Hippokampus kommt es zu einer Toleranzentwicklung gegenüber höheren GK-Spiegeln im späteren Leben. Die betroffenen antenatal mit DM-vorbehandelten Tiere müssten einen persistierenden Hyperkortisolismus und eine lebenslange Änderung des Tonus des autonomen Nervensystems aufweisen (siehe 2.2). Dies muss jedoch in Folgeuntersuchungen nachgewiesen werden.

Unsere Hypothese für den größeren Schlaganfall ist: Die Hyperaktivität der Stressachse führt zu einer permanenten Desensitivierung der GR im Immunsystem. Selbst die durch die Hyperaktivität der Stressachse ausgeschütteten erhöhten Kortisol-Spiegel führen damit nur zu einer unzureichenden Immunsuppression. Die gestörte Suppression der zerebralen und systemischen Inflammationsreaktion nach einer zerebralen Ischämie bedingt eine Verstärkung der sekundären zerebralen Inflammationsreaktion. Die mit der gestörten Immunsuppression einhergehende verstärkte zerebrale Entzündungsreaktion in der Penumbra eines Hirninfarktes resultiert vermutlich in einer Vergrößerung des Schlaganfalls, in einer Verschlechterung des Schlaganfalloutcomes und in einer Verminderung der Neuroneogenese nach einer ischämischen Hirnschädigung. Das parasympathische cholinerge System hat eine antiinflammatorische Wirkung, während eine sympathische Aktivierung einen proinflammatorischen Effekt aufweist und demzufolge zu einem verschlechterten Schlaganfalloutcome führt (Chamorro et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuchstiere weder auf die Kortikosteron-Spiegel noch auf die Neurotransmitter-Konzentrationen hin untersucht, so dass ein die Hirnentwicklung und -funktion beeinflussender Effekt einer antenatalen GK-Gabe auf das Schlaganfalloutcome mittels weiterer Studien zu überprüfen ist. Die potentiell erhöhten Kortikosteron-Spiegel können außerdem akute Effekte auf das Schlaganfalloutcome haben.

6.2.5.2 Akute Effekte erhöhter Glukokortikoid-Spiegel auf eine ischämische Hirnschädigung

Während GK in physiologischen Dosierungen essentiell für das Überleben der Nervenzellen sind, wirken sie in supraphysiologische Dosen neurotoxisch und verstärken darüber hinaus einen ischämischen Hirnschaden (Sapolsky und Pulsinelli 1985, Hassan et al. 1996). Im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von GR im Neokortex und im Caudoputamen reagieren diese Hirnregionen besonders vulnerabel auf eine zerebrale Hypoxie bzw. Ischämie, wobei GK die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung in diesen Regionen verstärken (Sapolsky und Pulsinelli 1985). Demgegenüber reagieren Hirnregionen mit einer geringeren Anzahl an GR (z.B. das Zerebellum) auf eine zerebrale Hypoxie bzw. Ischämie nicht mit einer Exazerbation des neuronalen Schadens bei höheren GK-Spiegeln (Packan und Sapolsky 1990). Die pyramidalen Neurone in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus bilden -im Vergleich zu jeder anderen neuronalen Population- die höchsten Spiegel von GR aus. Aufgrund dessen besitzen insbesondere diese beiden Regionen die wohl am stärksten ausgeprägte Vulnerabilität gegenüber ischämischen Ereignissen (Smith-Swintosky et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit bewirken die GK in dem gegenüber einer zerebralen Ischämie besonders vulnerablen Hippokampus im Bereich der CA3-Region sowie in der CA1-/CA2-Region deutlich mehr nekrotische Zelluntergänge und eine größere MAP2-Abschwächung im Vergleich zu den Kontrollen (siehe 5.5.1 und 5.5.2). In Hinblick auf die nekrotischen Zelluntergänge innerhalb der CA4-Region des Hippokampus ist eine Zunahme lediglich bei den weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren ersichtlich (siehe 5.5.1). Ähnlich verhält es sich in Bezug auf die MAP2-IR, die in der CA4-Region sowie im inneren und äußeren Blatt des Gyrus dentatus bei den weiblichen mit DM-vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den Sham-Tieren signifikant verringert ist (siehe 5.5.2). Im Gegensatz dazu ergeben sich in der hippokampalen Region des Subiculum keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen. Der Hippokampus, welcher eine hohe Anzahl an GR beinhaltet (im Speziellen: einer 3-fach höheren GR-Konzentration als in jeder anderen Hirnregion), ist die primäre Zielstruktur für GK-Reaktionen im ZNS und interessanterweise auch die mit Abstand am vulnerabelste Hirnregion gegenüber einer zerebralen Hypoxie bzw. Ischämie (Sapolsky 1985, Packan und Sapolsky 1990, Uno et al. 1994, Scully und Otten 1995).

Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass GK die zelluläre Vulnerabilität gegenüber einer Ischämie insbesondere innerhalb des Hippokampus erhöhen (Sapolsky et al. 1990, Krugers et al. 2000). Dies beruht auf verschiedenen Mechanismen. GK erhöhen den Blutglucose-Spiegel über eine Stimulation der hepatischen Glukoneogenese sowie über die Reduzierung der peripheren Glucose-Utilisation (Slivka und Murphy 2001). Dies geschieht möglicherweise über eine Antagonisierung der Insulineffekte (Slivka und Murphy 2001). Diese GK-bedingte Hyperglykämie führt zur Exazerbation des neuronalen Schadens in Folge einer zerebralen Ischämie (De Courten-Myers et al. 1988, Slivka und Murphy 2001). Die erhöhten Blutglucose-Spiegel verstärken die anaerobe Glykolyse, die zu einer vermehrten Laktatbildung und einem damit verbundenen pH-Wert-Abfall beiträgt (Raichle 1983). Im weiteren Verlauf kann ein gesteigerter Aufbau exzitatorischer Aminosäuren verbunden mit einem verstärkten intrazellulären Kalzium-Einstrom beobachtet werden, was in einer Veränderung des Gleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition resultiert (Horner et al. 1990, Virgin et al. 1991). Langfristig latent erhöhte GK-Spiegel, wie sie antenatal über eine Hyperaktivität der Stressachse programmiert werden können, haben nachteilige Effekte auf verschiedene Organsysteme (Scully und Otten 1995). In diesem Zusammenhang führen chronisch erhöhte GK-Spiegel zu einer Vielzahl pathologischer Veränderungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ II, Hypertonie, Wachstumsretardierung, Immunsuppression, Infertilität und Neurotoxizität (Scully und Otten 1995). Im Gegensatz zu den negativen Effekten wird der Organismus verstärkt mit energiereichen Substraten versorgt, um kurzfristig die Anpassungsfähigkeit an die gegebene Situation zu verbessern. In dieser Hinsicht steigern GK den katabolen Stoffwechsel von Triglyceriden, Glykogen und Proteinen, während anabolische Prozesse unterdrückt werden. Darüber hinaus wird die Glukoneogenese verstärkt und eine Blockade der zellulären Glucose-Aufnahme eingeleitet (Scully und Otten 1995).

In Folge hoch-physiologischer GK-Konzentrationen kommt es zur Schädigung pyramidalen Neurone vor allem in der CA3-Region des Hippokampus und weiterhin - wenngleich in geringerem Ausmaß - in der CA1-Region und dem Gyrus dentatus (Sapolsky et al. 1985). Die pyramidalen Neurone innerhalb der CA3- und CA4-Region des Hippokampus gehen mit den GR unter, so dass die negative Rückkopplung der Stressachse vermindert ist (Uno et al. 1994). Auf dessen Boden

kann sich ein Hyperkortisolismus aufbauen (Uno et al. 1994). Darüber hinaus bewirkt Stress bei Ratten eine Atrophie der Dendriten pyramidaler Neurone innerhalb des Hippokampus (Watanabe et al. 1992). Das Muster des hippokampalen Schadens, welches in Folge einer hochdosierten GK-Gabe beobachtet werden kann, ist ähnlich der Schädigung innerhalb eines normal gealterten Gehirns (Scully und Otten 1995). Es finden sich eine verringerte Zahl an pyramidalen Neuronen vor allem in der CA3-Region, ein Verlust von GR (wahrscheinlich in Folge des Verlustes der rezeptortragenden Neurone) und eine deutliche Gliose der Astrozyten (Scully und Otten 1995). Es besteht vermutlich eine positive Korrelation zwischen steigenden GK-Spiegeln und einer hippokampalen Degeneration bzw. kognitiven Defiziten beim alternden Menschen (Lupien et al. 1994). Darüber hinaus sind neuronale Dysfunktionen beim Menschen häufig assoziiert mit steigenden GK-Konzentrationen, wie beispielsweise bei der Alzheimer Erkrankung mit einer hippokampalen Atrophie (DeLeon et al. 1988), einem Hyperkortisolismus bei depressiven Patienten (Wolkowitz et al. 1990) oder dem Morbus Cushing (Bentson et al. 1978, Okuno et al. 1980, Starkman et al. 1992). Abschließend kann festgehalten werden, dass das Altern sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren mit einer erhöhten basalen Sekretion von GK assoziiert ist, was vermutlich eine Rolle bei der beeinträchtigten Resistenz des gealterten Hippokampus gegenüber neurologischen Insulten spielt (Stein-Behrens et al. 1994). Die in Folge einer antenatalen Gabe erhöhten GK-Spiegel führen über eine Hyperaktivität der Stressachse zu einer gesteigerten Vulnerabilität des Gehirns gegenüber einer zerebralen Ischämie.

Die genannten neurotoxischen GK-Effekte (Packan und Sapolsky 1990, Hassan et al. 1996) scheinen insgesamt über GR vermittelt zu sein (Tuor 1997) und damit eine genomischen Wirkung zu haben. Bei Stress werden Konzentrationen von Kortikosteron ausgeschüttet, die neben dem protektiven MR auch den schädlichen GR aktivieren, was wiederum zur Induktion der Apoptose und damit dem Verlust hippokampaler Neurone führt (Sapolsky und Pulsinelli 1985, Hassan et al. 1996). Die GK können als Transkriptionsfaktoren agieren, indem sie an hormonsensitive Elemente innerhalb des Genoms binden und die Transkription bestimmter Zielgene steigern oder hemmen. In diesem Zusammenhang werden 2 verschiedene Typen von GR unterschieden, die beide als pleiotrope Transkriptionsfaktoren wirken (Scully und Otten 1995).

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Immerhin etwa 10% aller Schwangeren werden derzeit aufgrund einer drohenden Frühgeburt im letzten Drittel der Schwangerschaft mit synthetischen GK behandelt. In Folge der beschleunigten fetalen Lungenreifung mit einer konsekutiv verminderten Inzidenz von Atemwegserkrankungen, eines reduzierten Auftretens intraventrikulärer Hämorrhagien (Crowley et al. 1990) sowie dem geringeren Einsatz von mechanischer Beatmung resultiert die antenatale GK-Therapie in einer reduzierten Morbidität und Mortalität des Frühgeborenen, weshalb diese für Frauen mit einem Frühgeburtsrisiko in der 24. bis 34. SSW empfohlen wird (Baud 2004, Stiles 2007, Wapner et al. 2007). In diesem Zusammenhang gehören maternal applizierte GK mittlerweile zur klinischen Routine (Elitt et al. 2003).

Im Gegensatz zu den genannten positiven GK-Effekten zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung nach durchgeführter MCAO bei den antenatal mit DM-vorbehandelten Ratten im Senium eine deutliche Verstärkung des neuronalen Zellschadens mit einem größeren Infarktvolume im Vergleich zu den Kontrollen. Die gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass die klinisch genutzte antenatale GK-Gabe in der zur Beschleunigung der Lungenreifung verwendeten Dosis zu einer erhöhten Vulnerabilität des adulten Gehirns gegenüber hypoxisch-ischämischen Insulten führt. Aufgrund der nachteiligen GK-Effekte sollte die antenatale medikamentöse GK-Exposition auf ein notwendiges Minimum reduziert werden. Trotz der effektiven Morbiditäts- und Mortalitätssenkung beim Frühgeborenen sollte sich deshalb lediglich unter Bedingungen einer strengen Indikationsstellung für jede individuelle Schwangerschaft auf eine einmalige antenatale GK-Gabe beschränkt werden (NIH 1995).

Meines Wissens waren die neurotoxischen Effekte einer antenatalen GK-Therapie bei Ratten im Senium bisher noch kein Schwerpunkt experimenteller Studien, sodass die vorliegende Untersuchung Pionierarbeit bei der Aufdeckung der ursächlichen Mechanismen leistet. In dieser Hinsicht wurde aufgrund der gewonnenen Ergebnisse die Vermutung gestellt, dass eine antenatale GK-Gabe in der klinisch zur Förderung der Lungenreifung genutzten Dosis die Fetale Programmierung für die Prädisposition späterer Erkrankungen oder -wie in der vorliegenden Arbeit- ein schlechteres Schlaganfalloutcome auslöst.

Jedoch ist eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen mit Einschränkungen zu betrachten, da die Ratte als postnataler Hirnentwickler eine zeitlich vom Menschen abweichende Hirnreifung zeigt. Darüber hinaus dürfen bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse andere Mechanismen und Vorgänge (z.B. eine vorbestehende Depression), die das Schlaganfalloutcome beeinflussen könnten, nicht außer Acht gelassen werden. Aus diesem Grund sind zukünftig weitere experimentelle Studien (z.B. am jungen adulten Gehirn, um eine Altersabhängigkeit aufzuzeigen oder z.B. anhand von Knockout-Mäusen, die aufgrund fehlender GR keine neurotoxischen GK-Effekte zeigen dürften) notwendig, um die exakten Mechanismen der Einflussnahme einer antenatalen GK-Therapie auf die Fetale Programmierung für die Prädisposition späterer Erkrankungen darzustellen und die Rolle zusätzlicher Risikofaktoren (z.B. Arteriosklerose, Nikotinabusus) abzugrenzen.

8 Literaturverzeichnis

- Adachi N, Chen J, Liu K, Tsubota S, Arai T. 1998. Dexamethasone aggravates ischemia-induced neuronal damage by facilitating the onset of anoxic depolarization and the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18:274-280.
- Ahima RS, Krozowski Z, Harlan RE. 1991. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol*, 313:522-538.
- Altman DI, Young RSK, Yagel SK. 1984. Effects of dexamethasone in hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Biol Neonate*, 46:149-156.
- Anderson DK, Dugan LL, Means ED, Horrocks LA. 1994. Methylprednisolone and membrane properties of primary cultures of mouse spinal cord. *Brain Res*, 637:119-125.
- Andreeva N, Khodorov B, Stelmashook E, Cragoe E, Victorov I. 1991. Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res*, 548:322-325.
- Antonow-Schlorke I, Helgert A, Müller T, Schubert H, Nathanielsz PW, Schwab M. 2007. Prenatal betamethasone treatment at clinical doses perturbs myelination in the fetal sheep brain dependant on gestational age and treatment course. *J Soc Gynecol Invest*, 14(Suppl.):676.
- Anwar M, Costa O, Sinha AK, Weiss HR. 1993. Middle cerebral artery occlusion increases cerebral capillary permeability. *Neurol Res*, 15:232-236.
- Anwar MA, Schwab M, Poston L, Nathanielsz PW. 1999. Betamethasone mediated vascular dysfunction and changes in hematological profile in the ovine fetus. *Am J Physiol*, 276:H1137-H1143.

- Aspey BS, Cohen S, Patel Y, Terruli M, Harrison MJG. 1998. Middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 24:487-497.
- Aspey BS, Taylor FL, Terruli M, Harrison MJG. 2000. Temporary middle cerebral artery occlusion in the rat: consistent protocol for a model of stroke and reperfusion. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26:232-242.
- Astrup J, Symon L, Siesjö BK. 1981. Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. *Stroke*, 12:723-725.
- Avendaño C, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E. 1995. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res*, 673:83-92.
- Ballard PL, Ballard RA. 1995. Scientific basis and therapeutic regimes for use of antenatal glucocorticoids. *J Obstet Gynaecol*, 173:254-262.
- Barker DJ, Bagby SP, Hanson MA. 2006. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2(12):700-707.
- Baud O. 2004. Postnatal steroid treatment and brain development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 89:96-100.
- Baud O, Sola A. 2007. Corticosteroids in perinatal medicine: how to improve outcomes without affecting the developing brain? *Semin Fetal Neonatal Med*, 12(4):273-279.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartowski H. 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17[No 3]:472-476.

- Behrmann DL, Bresnahan JC, Beattie MS. 1994. Modeling of acute spinal cord injury in the rat: Neuroprotection and enhanced recovery with methylprednisolone, U-74006F and YM-14673. *Exp Neurol*, 126:61-75.
- Belayev L, Alonso AF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. 1996. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. *Stroke*, 27:1616-1623.
- Bentson J, Reza M, Winter J, Wilson G. 1978. Steroids and apparent cerebral atrophy on computed tomography scans. *J Comput Assist Tomogr*, 2:16-23.
- Bernhardt R, Matus A. 1984. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol.*, 226:203-221.
- Bershadsky AD, Vasiliev JM. 1989. *Cytoskeleton*. Plenum Press. New York.
- Betz AL, Iannotti F, Hoff JT. 1989. Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1:133-154.
- Bignami A, Dahl D. 1974. Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J comp Neurol*, 153:27-38.
- Bignami A, Dahl D. 1976. Astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropath appl Neurobiol*, 2:99-110.
- Böck P, Hrsg. 1989. *Romeis Mikroskopische Technik*. 17. Aufl. München: Verlag Urban und Schwarzenberg.
- Bolander HG, Persson L, Hillered L, d'Argy R, Ponten U, Olsson Y. 1989. Regional cerebral blood flow and histopathologic changes after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 20:930-937.

- Bradford HF, Young AMJ, Crowder JM. 1987. Continuous glutamate leakage from brain cells is balanced by compensatory high-affinity reuptake transport. *Neuroscience*, 81:296-302.
- Bréant B, Gesina E, Blondeau B. 2006. Nutrition, glucocorticoids and pancreas development. *Horm Res*, 65:98-104.
- Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W. 1988. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8:474-485.
- Butler TL, Kassed CA, Sanberg PR, Willing AE, Pennypacker KR. 2002. Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*, 929:252-260.
- Carswell HVO, Anderson NH, Clark JS, Graham D, Jeffs B, Dominiczak AF, Macrae IM. 1999. Genetic and gender influences on sensitivity to focal cerebral ischemia in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 33:681-685.
- Chamorro A, Amaro S, Vargas M, Obach V, Cervera A, Gomez-Choco M, Torres F, Planas AM. 2007. Catecholamines, infection, and death in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 252:29-35.
- Chao HM, Sakai RR, Ma LY, McEwen BS. 1998. Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology*, 139(7):3112-3118.
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq MD, Balentine JD. 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*, 17:738-743.

- Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikstrom AC, Gustaffsson AJ, Fuxe K. 1994. Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 62:843-897.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7-17.
- Coert BA, Anderson RE, Meyer FB. 1999. Reproducibility of cerebral cortical infarction in the Wistar rat after middle cerebral artery occlusion. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 8:380-387.
- Coyle P. 1975. Arterial patterns of the rat rhinencephalon and related structures. *Exp Neurol*, 49:671-690.
- Coyle P. 1982. Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke*, 13:855-859.
- Coyle P, Jokelainen PT. 1982. Dorsal cerebral arterial collaterals of the rat. *Anat Rec*, 203:397-404.
- Coyle P, Odenheimer BA, Sing CF. 1984. Cerebral infarction after middle cerebral artery occlusion in progenies of spontaneously stroke-prone and normal rats. *Stroke*, 15:711-716.
- Crowley P, Chalmers I, Keirse MJ. 1990. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *J Obstet Gynaecol Br*, 97:11-25.
- Dahlgren N, Nilsson B, Sakabe T, Siesjo BK. 1981. The effect of indomethacin on cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat at normal and increased carbon dioxide tensions. *Acta Physiol Scand*, 111:475-485.
- Dawson DA, Hallenbeck JM. 1996. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: Description of temporal changes and utilization as a marker for

- volumetric assessment of acute brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16:170-174.
- De Courten-Myers GM, Myers RE, Schoolfield L. 1988. Hyperglycemia enlarges infarct size in cerebrovascular occlusion in cats. *Stroke*, 19:623-630.
- De Courten-Myers GM, Kleinholz M, Wagner KR, Xi G, Myers RE. 1994. Efficacious experimental stroke treatment with high-dose methylprednisolone. *Stroke*, 25:487-493.
- DeLeon M, McRae T, Tasi J, George A, Marcus D, Freedman M, Wolf A, McEwen B. 1988. Abnormal cortisol response in Alzheimer's disease linked to hippocampal atrophy. *Lancet*, 2:391-392.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW. 1997. A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol*, 499:217-226.
- Diener HC, Hacke W, Forsting M, Hrsg. 2004. Schlaganfall. Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
- Dornblüth O. 2004. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 260. Aufl. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Drummond JC, Oh YS, Cole DJ, et al. 1989. Phenylephrine-induced hypertension reduces ischemia following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 20:1538-1544.
- Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. 1996. Very delayed infarction after delayed focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab*, 16:196-201.

- Eklöf B, Siesjö BK. 1973. Cerebral blood flow in ischemia caused by carotid artery ligation in the rat. *Acta Physiol Scand*, 87:69-77.
- Elimian A, Verma U, Canterino J, Shah J, Visintainer P, Tejani N. 1999. Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet Gynecol*, 93:174-179.
- Elitt CM, Sadowska GB, Stopa EG, Pinar H, Petersson KH, Stonestreet BS. 2003. Effects of antenatal steroids on ischemic brain injury in near-term ovine fetuses. *Early Hum Dev*, 73:1-15.
- Endo Y, Nishimura JI, Kimura F. 1994. Adrenalectomy increases local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Pflugers Arch*, 426:183-188.
- Endo Y, Nishimura JI, Kobayashi S, Kimura F. 1997. Long-term glucocorticoid treatments decrease local cerebral blood flow in the rat hippocampus, in association with histological damage. *Neuroscience*, 79:745-752.
- Eng LF, DeArmond SJ. 1981. Glial fibrillary acidic (GFAP) protein immunocytochemistry in development and neuropathology. *Prog Clin Biol Res*, 59A:65-79.
- Faraci FM, Heistadt DD. 1998. Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*, 78:53-97.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*, 180:114-121.
- Friese K, Dudenhausen JW, Kirschner W, Schafer A, Elkeles T. 2003. [Risk factors of premature birth and their significance for prevention and health promotion--an analysis based on the BabyCare Program]. *Gesundheitswesen*, 65 (8-9):477-485.

- Garcia JH. 1984. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke*, 15:5-14.
- Garcia JH, Yoshida Y, Chen H, Li Y, Zhang ZG, Lian J, Chen S, Chopp M. 1993. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*, 142:623-635.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu X. 1995. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 26:627-635.
- Garcia JH, Liu KF, Ye ZR, Gutierrez JA. 1997. Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 28:2303-2310.
- Gibson CL, Gray LJ, Murphy SP, Bath PMW. 2006. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26:1103-1113.
- Ginsberg MD, Busto R. 1989. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*, 20:1627-1642.
- GoppeltStruebe M. 1997. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. *Biochem Pharmacol*, 53:1389-1395.
- Goto Y, Kassell NF, Hiramatsu K, et al. 1993. Effects of intranschemic hypothermia on cerebral damage in a model of reversible focal ischemia. *Neurosurgery*, 32:980-985.
- Hadoke PWF, Lindsay RS, Seckl JR, Walker BR, Kenyon CJ. 2006. Altered vascular contractility in adult female rats with hypertension programmed by prenatal glucocorticoid exposure. *J Endocrinol*, 188:435-442.

- Hakim AM, Hogan MJ, Carpenter S. 1992. Time course of cerebral blood flow and histological outcome after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 23:1138-1144.
- Hall ED. 1992. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*, 76:13-22.
- Hallenbeck JM, Dutka AJ. 1990. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch Neurol*, 47:1245-1254.
- Hassan AHS, Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OFX. 1996. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, 140:43-52.
- Hazell AS. 2007. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int*, 50:941-953.
- Heinel LA, Rubin S, Rosenwasser RH, Vasthare US, Tuma RF. 1994. Leukocyte involvement in cerebral infarct generation after ischemia and reperfusion. *Brain Res Bulletin*, 34:137-141.
- Herrera DG, Cuellar AC. 1992. Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity following cortical devascularizing lesion. *Neuroscience*, 49[No 4]:781-791.
- Herz RC, Jonker M, Verheul HB, et al. 1996. Middle cerebral artery occlusion in Wistar and Fischer-344 rats: Functional and morphological assessment of the model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16:296-302.
- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple testing procedure. *Scand J Statistics*, 6:65-76.
- Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM. 1990. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology*, 52:57-64.

- Hossmann AK, Mies G, Paschen W. 1985. Multiparametric imaging of blood flow and metabolism after middle cerebral artery occlusion in cats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 5:97-107.
- Iadecola C, Alexander M. 2001. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol*, 14:89-94.
- Jacewicz M, Kiessling M, Pulsinelli WA. 1986. Selective gene expression in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6:263-272.
- Karhunen H, Pitkänen Asla, Virtanen Tiina, Gureviciene I, Pussinen R, Ylinen Aarne, Sivenius J, Nissinen J, Jolkkonen J. 2003. Long-term functional consequences of transient occlusion of the middle cerebral artery in rats: a 1-year follow-up of the development of epileptogenesis and memory impairment in relation to sensorimotor deficits. *Epilepsy Res*, 54:1-10.
- Kauppinen RA, Enkvist K, Holopainen I, Akerman KEO. 1988. Glucose deprivation depolarizes plasma membrane of cultured astrocytes and collapses transmembrane potassium and glutamate gradients. *Neuroscience*, 27:283-289.
- Kharlamov A, Kim DK, Jones SC. 2001 Early visual changes in reflected light on non-stained brain sections after focal ischemia mirror the area of ischemic damage. *J Neurosci Methods*, 111:67-73.
- Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, Koga N, Itoyama Y, Abe K. 1998. Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 29:1417-1422.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, et al. 1989. Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage. Immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience*, 31:401-411.

- Klatzo I. 1967. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*, 17:548-564.
- Koenen SV, Mecenas CA, Smith GS, Jenkins S, Nathanielsz PW. 2002. Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 186:812–817.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. 1986. Experimental studies of ischemic brain edema: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*, 8:1-8.
- Krusters HJ, Maslam S, Korf J, Joëls M. 2000. The corticosterone synthesis inhibitor metyrapone prevents hypoxia/ischemia-induced loss of synaptic function in the rat hippocampus. *Stroke*, 31:1162-1172.
- Latov N, Nilaver G, Zimmermann EA, Johnson WG, Silverman AJ, Defendini R, Cote L. 1979. Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury. *Dev Biol*, 72:381-384.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M et al. 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:11032–11037.
- Li GL, Farooque M, Lewen A, Lennmyr F, Holtz A, Olsson Y. 2000. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat. *APMIS*, 108:98-106.
- Li K, Futrell N, Tovar S, Wang LC, Wang DZ, Schultz LR. 1996. Gender influences the magnitude of the inflammatory response within embolic cerebral infarcts in young rats. *Stroke*, 27:498-503.

- Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY. 1993. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke*, 24:117-121.
- Liu CC, Chien CH, Lin MT. 2000. Glucocorticoids reduce interleukin-1 β concentration and result in neuroprotective effects in rat heatstroke. *J Physiol*, 527.2:333-343.
- Ljunggren B, Ratcheson RA, Siesjo BK. 1974. Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res*, 73:291-307.
- Lüllmann H. 2003. *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Lupien S, Lecours AR, Lussier I, Schwartz G, Nair NPV, Meaney MJ. 1994. Basal cortisol levels and cognitive defects in human aging. *J Neurosci*, 14:2893-2903.
- Malmgren R, Warlow C, Bamford J, Sandercock P. 1987. Geographical and secular trends in stroke incidence. *Lancet*, 2:1196-1200.
- Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF. 2005. Annual summary of vital statistics—2003. *Pediatrics*, 115:619-634.
- Masferrer JL, Seibert K. 1994. Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor*, 4:25-30.
- Matthews SG. 2000. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res*, 47(3):291-300.
- McMillen IC, Robinson JS. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*, 85: 571–633.
- Meadow WL, Bell A, Sunstein CR. 2003. Statistics, not memories: what was the standard of care for administering antenatal steroids to women in preterm labor between 1985 and 2000? *Obstet Gynecol*, 102:356-362.

- Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjö BK. 1992. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res*, 89:67-78.
- Mies G, Ishimaru S, Xie Y, Seo K, Hossmann KA. 1991. Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 11:753-761.
- Miyazawa T, Bonnekoh P, Hossmann KA. 1993. Temperature effect on immunostaining of microtubule-associated protein 2 and synaptophysin after 30 minutes of forebrain ischemia in rat. *Acta Neuropathol*, 85:526-532.
- Mobley PL, Sulser F. 1980. Adrenal corticosteroids regulate sensitivity of noradrenaline coupled adenylate cyclase in brain. *Nature*, 286:608-609.
- Modi N, Lewis H, Al-Naqeeb N, Ajayi-Obe M, Doré CJ, Rutherford M. 2001. The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain. *Pediatr Res*, 50(5):581-585.
- Nagasawa H, Kogure K. 1989. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 20:1037-1043.
- Nagel S, Wagner S, Koziol J, Kluge B, Heiland S. 2004. Volumetric evaluation of the ischemic lesion size with serial MRI in a transient MCAO model of the rat: comparison of DWI and T1WI. *Brain Res Protocols*, 12:172-179.
- Nedergaard M. 1987. Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction. *Brain Res*, 408:79-85.
- NIH. 1995. Consensus Development Panel: Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *Jama*, 273:413-418.

- NIH. 2001. Consensus Development Panel: Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. *Obstet Gynecol*, 98:144-150.
- Norris JW, Hachinski VC. 1986. High dose steroid treatment in cerebral infarction. *Br Med J*, 292:21-23.
- Oehmichen M, Meissner C, Wurmb-Schwark N, Schwark T. 2003. Methodical approach to brain hypoxia/ischemia as a fundamental problem in forensic neuropathology. *Leg Med*, 5:190-201.
- Okuno T, Ito M, Yoshioka M, Nakano Y. 1980. Cerebral atrophy following ACTH therapy. *J Comput Assist Tomogr*, 4:20-23.
- Oliff HS, Weber E, Eilon G, et al. 1995. The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res*, 675:20-26.
- Oliff HS, Coyle P, Weber E. 1997. Rat Strain and Vendor Differences in Collateral Anastomoses. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 571–576.
- Osborne KA, Shigeno T, Ballarsky AM, Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham DI. 1987. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 50:402-410.
- Packan DR, Sapolsky RM. 1990. Glucocorticoid endangerment of the hippocampus: tissue, steroid and receptor specificity. *Neuroendocrinology*, 51:613-618.
- Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50:427-434.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal YR, Pekna M. 2007. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol*, 82:95-111.

- Persson L, Hardemark HG, Bolander HG, Hillered L, Olsson Y. 1989. Neurologic and neuropathologic outcome after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 20:641-645.
- Petito CK, Chung M, Halaby IA, Cooper AJ. 1992. Influence of the neuronal environment on the pattern of reactive astrogliosis following cerebral ischemia. *Prog Brain Res*, 94:381-387.
- Pettigrew LC, Holtz ML, Craddock SD, Minger SL, Hall N, Geddes JW. 1996. Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16:1189-1202.
- Phillips DI, Jones A, Goulden PA. 2006. Birth weight, stress, and the metabolic syndrome in adult life. *Ann N Y Acad Sci*, 1083:28-36.
- Popa-Wagner A, Schröder E, Schmoll H, Walker LC, Kessler C. 1999. Upregulation of MAP1B and MAP2 in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: Effect of age. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17:425-434.
- Raichle ME. 1983. The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol*, 13:2-10.
- Reglödi D, Tamás A, Lengvári I. 2003. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bulletin*, 59:459-466.
- Reul JM, De Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in the rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117:2505-2512.
- Rieke GK, Bowers DE, Penn P. 1981. Vascular supply pattern to rat caudoputamen and globus pallidus: Scanning electronmicroscopic study of vascular endocast of stroke-prone vessels. *Stroke*, 12:840-847.

- Robinson RG, Shoemaker WJ, Schlumpf M, Valk F, Bloom FE. 1975. Effect of experimental cerebral infarction in the rat brain on catecholamines and behavior. *Nature*, 225:332-334.
- Robinson RG. 1979. Differential behavior and biochemical effects of right and left hemispheric infarction in the rat. *Science*, 205:707-710.
- Rosen GD, Harry JD. 1990. Brain volume estimation from serial section measurements: A comparison of methodologies. *J Neurosci Methods*, 35:115-124.
- Salford LG, Plum F, Siesjo BK. 1973. Graded hypoxic oligemia in rat brain: biochemical alterations and their implications. *Arch Neurol*, 29:227-233.
- Sapolsky RM. 1985. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: Temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res*, 359:300-305.
- Sapolsky RM. 2003. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res*, 28(11):1735-1742.
- Sapolsky RM, Krey L, McEwen B. 1985. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J Neurosci*, 5:1221-1227.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1986. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*, 7:284-301.
- Sapolsky RM, Pulsinelli WA. 1985. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science*, 229:1397-1400.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, 10(9):2897-2902.

- Schaldach H, Hrsg. 1980. Wörterbuch der Medizin. 11. Aufl. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit.
- Schmidt-Kastner R, Szymas J, Hossmann KA. 1990. Immunohistochemical study of glial reaction and serum-protein extravasation in relation to neuronal damage in rat hippocampus after ischemia. *Neuroscience*, 38:527-540.
- Schmidt-Kastner R, Freund TF. 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40:599-636.
- Schwab K, Groh T, Coksaygen T, Müller T, Schubert H, Nathanielsz PW, Schwab M. 2007. Betamethasone treatment induces programming of glucocorticoid resistance and depression-like functional disturbances in the fetal sheep brain. *Early Human Dev*, 83: S129.
- Schwab M. 2002. Die Beeinflussung der fetalen Hirnfunktion durch Glukokortikoide sowie vibroakustische und thermische Stimulation [Habilitationsschrift]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Schwab M. 2007. Fetale Hirnentwicklung und Programmierung von zerebralen Funktionsstörungen. *Gynäkologe*, 40:256-263.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Zwiener U, Bauer R. 1998. Brain-derived peptides reduce the size of cerebral infarction and loss of MAP2 immunoreactivity after focal ischemia in rats. *J Neural Transm*, 53:299-311.
- Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Müller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz PW. 2000. Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol*, 528.3:619-632.
- Schwab M, Schwab K, Groh T, Kott M, Nathanielsz PW, Witte OW. 2005. Antenatal betamethasone treatment enhances development of ovine fetal brain function at the expense of a persistently altered sleep architecture. *Ped Res*, 58:1084.

- Scully JL, Otten U. 1995. Glucocorticoids, Neurotrophins and Neurodegeneration. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 52:391-401.
- Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI. 1985. Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J Neurosurg*, 63:272-277.
- Shinwell ES, Karplus M, Reich D, Weintraub Z, Blazer S, Bader D, Yurman S, Dolphin T, Kogan A, Dollberg S, Arbel E, Goldberg M, Gur I, Naor N, Sirota L, Mogilner S, Zaritsky A, Barak M, Gottfried E. 2000. Early postnatal dexamethasone treatment and increased incidence of cerebral palsy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 83:F177-F181.
- Shinwell ES, Lerner-Geva L, Lusky A, Reichman B. 2007. Less postnatal steroids, more bronchopulmonary dysplasia: a population-based study in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 92:F30-F33.
- Siesjö BK. 1988. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med*, 16:954-963.
- Siesjö BK. 1992. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I. Pathophysiology. *J Neurosurg*, 77:169-184.
- Slivka AP, Murphy E, Rosenberg TA, Horrocks LA. 1995. Cerebral edema following temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 26:1061-1065.
- Slivka AP, Murphy EJ. 2001. High-dose methylprednisolone treatment in experimental focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*, 167:166-172.
- Slotkin TA, Barnes GA, McCook EC, Seidler FJ. 1996. Programming of brainstem serotonin transporter development by prenatal glucocorticoids. *Brain Res Dev Brain Res*, 93(1-2):155-161.

- Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Sapolsky RM, Phares C, Craddock SD, Brooke SM, Mattson MP. 1996. Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16:585-598.
- Son GH, Geum D, Chung S, Kim EJ, Jo JH, Kim CM, Lee KH, Kim H, Choi S, Kim HT, Lee CJ, Kim K. 2006. Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *J Neurosci*, 26(12):3309-3318.
- Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Schteingart DE. 1992. Hippocampal formation volume, memory dysfunction and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiat*, 32:756-765.
- Stein HM, Oyama K, Martinez A, Chappell BA, Buhl E, Blount L, Padbury JF. 1993. Effects of corticosteroids in preterm sheep on adaptation and sympathoadrenal mechanisms at birth. *Am J Physiol*, 264:E763-769.
- Stein-Behrens BA, Lin WJ, Sapolsky RM. 1994. Physiological elevations of glucocorticoids potentiate glutamate accumulation in the hippocampus. *J Neurochem*, 63:596-602.
- Stiles AD. 2007. Prenatal corticosteroids - early gain, long-term questions. *N Engl J Med*, 357:1248-1250.
- Sugo N, Hurn PD, Morahan MB, Hattori K, Traystman RJ, DeVries AC. 2002. Social stress exacerbates focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 33:1660-1664.
- Sutherland GR, Dix GA, Auer RN. 1996. Effect of age in rodent models of focal and forebrain ischemia. *Stroke*, 27:1663-1668.
- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. 1990. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10:290-293.

- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*, 4:193-205.
- Symon L, Dorsch NW, Crockard HA. 1975. The production and clinical features of a chronic stroke model in experimental primates. *Stroke*, 6:476-481.
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. 1990. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, 348:443-446.
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. 1981. Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1:53-60.
- Tan WK, Anderson RE, Meyer FB. 1997. Glucose and PaO₂ modulation of cerebral metabolic responses following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17:S303, (suppl 1, abstr).
- Tauzin L, Risso F, Buffat C, Serra G, Simeoni U. 2005. Vascular mechanisms in the developmental programming of cardio-vascular disease. *Pediatr Med Chir*, 27(5):18-23.
- Trepel M. 2004. *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. Dritte Aufl. München, Jena: Urban & Fischer Verlag.
- Tuor UI. 1997. Glucocorticoids and the prevention of hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev*, 21[No 2]:175-179.
- Tuor UI, Chumas PD, Del Bigio MR. 1995. Prevention of hypoxic-ischemic damage with dexamethasone is dependent on age and not influenced by fasting. *Exp Neurol*, 132:116-122.

- Tuor UI, Del Bigio MR. 1996. Protection against hypoxic-ischemic damage with corticosterone and dexamethasone: inhibition of effect by a glucocorticoid antagonist, RU38486. *Brain Res*, 743:258-262.
- Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM. 1990. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. *Dev Brain Res*, 53:157-167.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton A, Baker E, DeJesus O, Holden J. 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav*, 28(4):336-348.
- Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. 2004. Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129:1021-1029.
- Vergouwen MDI, Anderson RE, Meyer FB. 2000. Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 878:88-97.
- Virgin CE, Ha TP, Packan DR, Tombaugh GC, Yang SH, Horner HC, Sapolsky RM. 1991. Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J Neurochem*, 57:1422-1428.
- Wang RY, Wang PSG, Yang YR. 2003. Effect of age in rats following middle cerebral artery occlusion. *Gerontology*, 49:27-32.
- Wapner RJ, Sorokin Y, Mele L, Johnson F, Dudley DJ, Spong CY, Peaceman AM, Leveno KJ, Malone F, Caritis SN, Mercer B, Harper M, Rouse DJ, Thorp JM, Ramin S, Carpenter W, Gabbe SG. 2007. Long-term outcomes after repeat doses of antenatal corticosteroids. *N Engl J Med*, 357:1190-1198.
- Warner DS, Gionet TX, Todd MM, et al. 1992. Insulin-induced normoglycemia improves ischemic outcome in hyperglycemic rats. *Stroke*, 23:1775-1781.

- Warner DS, Ludwig PS, Pearlstein R, et al. 1995. Halothane reduces focal ischemic injury in the rat when brain temperature is controlled. *Anesthesiology*, 82:1237-1245.
- Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, 588:341-345.
- Weber OZ, Sobesky J, Lehnhardt FG, Hesselmann V, Frackowiak M, Neveling M, Jacobs AH, Heiss WD. 2004. Time to peak (TTP) als Marker der postischämischen Hyperperfusion? Ein Vergleich 150-Wasser-PET und PW-MRT. *Akt Neurol*, 31:10.1055.
- Welberg LA, Seckl JR. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol*, 13:113-128.
- Wilkinson LS, Davies W, Isles AR. 2007. Genomic imprinting effects on brain development and function. *Nat Rev Neurosci*, 8(11):832-843.
- Wolkowitz OM, Reus VI, Weingartner H, Thompson K, Breier A, Doran A, Rubinow D, Pickar D. 1990. Cognitive effects of corticosteroids. *Am J Psychiat*, 147:1297-1303.
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. 1976. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*, 7:46-53.
- Yang K, Jones SA, Challis JR. 1990. Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinology*, 126:11-17.
- Yi JH, Park SW, Kapadia R, Vemuganti R. 2007. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. *Neurochem Int*, 50:1014-1027.

- Yu ACH, Lee YL, Fu WY, Eng LF. 1995. Gene expression in astrocytes during and after ischemia. *Brain Res*, 105:245-253.
- Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke*, 20:84-91.
- Zhang ZG, Bower L, Zhang RL, Chen S, Windham JP, Chopp M. 1999. Three-dimensional measurement of cerebral microvascular plasma perfusion, glial fibrillary acidic protein and microtubule associated protein-2 immunoreactivity after embolic stroke in rats: a double fluorescent labeled laser-scanning confocal microscopic study. *Brain Res*, 844:55-66.
- Zheng Z, Yenari MA. 2004. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res*, 26:884-892.
- Zhu CZ, Auer RN. 1995. Graded hypotension and MCA occlusion duration: Effect in transient focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15:980-985.
- Zoppo del GJ. 1994. Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 6:47-96.

9 ANHANG

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Isabel Kaschowitz
geb. am 01. Mai 1984 in Gera
ledig

Schulbildung

1990-1994	Grundschule, Münchenbernsdorf
1994-2002	Georg Samuel Dörffel Gymnasium, Weida

Studium

Seit Oktober 2002	Studium der Humanmedizin, FSU Jena
September 2004	Physikum

Famulaturen

Ambulante Praxis Weida (Allgemeinmedizin)
Kreiskrankenhaus Eckernförde (Innere Medizin)
Herz- und Gefäßklinik Bad Neustadt (Anästhesie und Intensivmedizin)
Universitätsspital Zürich/Schweiz (Gynäkologie und Geburtshilfe)

Praktisches Jahr

2008 - 2009	SRH Wald-Klinikum Gera gGmbH
-------------	------------------------------

9.2 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich im Rahmen dieser Dissertation begleitet haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn PD Dr. med. habil Matthias Schwab danke ich für die Vergabe des Themas, die Unterstützung und Beratung sowie die vielen konstruktiven Diskussionen bei der Vorbereitung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Ohne die kompetente und sachkundige Hilfe von Frau Iwa Antonow wäre die Durchführung der lichtmikroskopischen, bildverarbeitenden und statistischen Auswertung nicht möglich gewesen. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Ina Ingrisch, stellvertretend für die Mitarbeiter des Forschungszentrums der FSU Jena, für die Hilfe bei der Erlernung der Techniken bedanken.

Ganz besonders herzlich danke ich meiner Familie und allen Freunden für ihre immer währende Geduld und Nachsicht. Ohne die ermutigenden Worte und den unaufhörlichen Beistand meiner lieben Eltern wäre ich heute nicht der Mensch, der ich bin. Ebenso danke ich meinem Lebensgefährten für sein großes Verständnis und die Kraft, die er mir in den besonders schweren Momenten verliehen hat.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr. med. Matthias Schwab (Klinik für Neurologie),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Isabel Kaschowitz